

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/044200 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/14, A01H 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014434
- (22) 国際出願日: 2003 年 11 月 13 日 (13.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
60/425,919 2002 年 11 月 13 日 (13.11.2002) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 本田技研工業株式会社 (HONDA MOTOR CO., LTD.) [JP/JP]; 〒107-8556 東京都港区南青山二丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 芦荻 基行 (ASHIKARI, Motoyuki) [JP/JP]; 〒465-0072 愛知県名古屋市中区東区牧の原 1-1401 ニューパビリオン加藤 407 Aichi (JP). 松岡 信 (MATSUOKA, Makoto) [JP/JP]; 〒458-0015 愛知県名古屋市中区緑区篠の風 3-252 滝ノ水住宅 9-203 Aichi (JP). 林 少揚 (LIN, Shaoyang) [CN/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・リサーチ・インスティテュート・ジャパン内 Saitama (JP). 山本 敏央 (YAMAMOTO, Toshio) [JP/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・リサーチ・

インスティテュート・ジャパン内 Saitama (JP). 西村 明日香 (NISHIMURA, Asuka) [JP/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・リサーチ・インスティテュート・ジャパン内 Saitama (JP). 高師 知紀 (TAKASHI, Tomonori) [JP/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・リサーチ・インスティテュート・ジャパン内 Saitama (JP).

- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: GENE ELEVATING CEREAL YIELD AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 穀物の収量を増加させる遺伝子、並びにその利用

(57) Abstract: Using the chain analysis method, a gene relating to increase and decrease in the grain number (including glumous flower, fruit and seed) of a plant is successfully isolated and identified. As the results of homology analysis, it is found out that this gene has a high homology with CKX (cytokinin oxidase). Furthermore, a breeding method of increasing the grain number (including glumous flower, fruit and seed) of a plant with the use of the above gene is developed. The gene and the method as described above are useful in the fields of improving plant varieties and so on.

(57) 要約:

連鎖解析により、植物の着粒数（顕花・果実・種子を含む）の増減に関する遺伝子の単離・同定に成功した。該遺伝子は相同性検索の結果、CKX（サイトカイニン酸化酵素）と高い相同性を有する遺伝子であることを見出した。また、該遺伝子を利用した植物の着粒数（花顕・果実・種子を含む）を増加させる育種手法も見出した。本発明は、植物の品種改良等の分野において有用である。



規則4.17に規定する申立て:

— AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,

PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための先の出願に基づく優先権を主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

穀物の収量を増加させる遺伝子、並びにその利用

5 技術分野

本発明は、植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）の増減に関する遺伝子の単離・同定、並びに該遺伝子を利用した植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）を増加させる育種手法に関する。

10 背景技術

世界人口が爆発的に増え続ける一方、環境汚染や地球温暖化・砂漠化による急激な耕地減少が起こっており、発展途上国を中心に慢性的な食糧不足が続いている。また現在、世界の年間人口増加率1.4%に対し、穀物生産増加率は1.0%と人口増加率に比べ低く、世界人口が80億を突破する2025年には、穀物需要は50%上昇すると予想され食糧不足は一層加速している。この深刻な状況を打破する為には、政治・経済的な政策はもちろん、穀物生産量を上昇させる科学的な穀物育種戦略が不可欠である。交配と選抜を主体とする従来育種ではもはやこの深刻な状況を回避する事はできず、収量増加を目指した穀物の草型研究と具体的かつ効率的な穀物育種が必須である。

20 1960年代世界の食糧危機が懸念された際、国際イネ研究所（フィリピン）においてミラクルライスと呼ばれる短秆多収イネが、国際ムギ・トウモロコシ研究所（メキシコ）において短秆多収コムギが育成され、これら両品種の速やかな普及により世界の食糧危機が回避された。いわゆる「緑の革命」である。両品種は従来品種の2倍の収量を示したが、この多収性は半矮性と呼ばれる短秆性の草型によ

25 ってもたらされた。すなわち多収を目指す場合、窒素肥料の投与が不可欠である

- 2 -

が、これは同時に草丈の伸長も誘導し、伸長した穀物は風雨により倒伏し収量を激減させる。一方、短秆品種は、施肥した場合でも、草丈の徒長なしに収量を増加させる事が可能となる。つまり「緑の革命」に貢献した両短秆品種は耐倒伏性を獲得する事によって、劇的に収量の増加をもたらした。現在においても、穀物の半矮性化は増収に多大に貢献しているが、既に多くの穀物品種は半矮性遺伝子を利用して、この技術を用いたさらなる増収は期待できず、新たな技術を利用した穀物生産技術の開発が必須である。

コメは世界の人類の 50% の人々が食糧として利用し、特にアジアに住む人々にとって、コメの栽培特性がモンスーンという多湿の気候条件に合い、長いあいだ主食としてエネルギーの供給源になっていたばかりでなく、深く生活・文化に根付き、これまでに様々な地域で育種が進められ、人類が利用しやすい性質に改善されてきた。また最近イネのゲノム塩基配列が決定されるなど、分子遺伝学的ツールが整いつつあり、ゲノム遺伝学を用いた新たな育種技術が期待されるところである。

これまで、穀類（植物）の収量増加のため、様々な試みが行われたが、直接的に収量増加を担う、花・種子（穎花）数の増減に関与する遺伝子について単離・同定が行われたという報告はなされていない。従来の穀物の半矮性化に加えて、花・種子（穎花）数の増減を制御する技術が開発されれば、さらなる穀物の収量の増加が期待される。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）の増減に関する遺伝子の単離・同定、並びに該遺伝子を利用した植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）を増加させる育種方法を提供することにある。

発明者らは、穀類（植物）の収量増加を試みるため、単子葉植物のモデルであ

るイネを用いて直接的に収量増加を担う遺伝子、すなわち花・種子（穎花）数の増減に関する遺伝子の探索を試みた。花・種子（穎花）数は複数の遺伝子の相互作用による量的形質(QTL)として支配されている。そこでまず、QTL解析を行う雑種集団の育成に先駆け、雑種集団の親となる品種の選定を試み、着粒数に明瞭な差が見られた日本型イネの「コシヒカリ」とインド型イネ「ハバタキ」2つの品種を選抜した（図1）。これら二つの品種を交雑したF1個体に、コシヒカリを反復親とした戻し交雑と自殖を行い、74系統のBC2F1、BC2F2およびBC3F2の集団を育成後、名古屋大学付属農場に展開した。BC2F2 74個体を用いて、着粒数に関するQTL解析を行った結果、着粒数を増加させる複数のQTLを検出した（図2）。特に第1染色体短腕約28cM近傍にハバタキのlocusがコシヒカリに対して着粒数を増加させる効果の大きいQTL(YQ1; Yielding QTL 1)を見いだすことに成功した（図2）。YQ1の存在を検証するために、返し戻し交雑とMASを用いて、YQ1準同質遺伝子系統を作製し、Nil-YQ1及びコシヒカリ（コントロール）の最大着粒数を調査した。その結果、QTL(YQ1)の存在を確認し、第1染色体短腕、約28cM近傍がハバタキに置換した系統は平均で50粒着粒数を増加させることがわかった。

次に74個体のBC2F1からそれぞれCTAB法を用いてDNAを抽出すると共全染色体を網羅的に包含する93個の分子マーカーを用いて各個体の遺伝子型を決定した。その自殖後代BC2F2を1系統に各10個体展開し、その中から、ランダムに1系統に1個体を選定し、選定した個体についてそれぞれ6穂をサンプリング後、各穂の着粒数を調査した。各系統6穂の内、最も着粒数の多かった穂を選出し、最大着粒数とした後、Qgeneソフトを用いてQTL解析を行った。

次にBC3F2集団を用いて、分子マーカーによる遺伝子型と表現型（F2及びF3）を調査し、再度連鎖解析を行った。その結果分子マーカー（6Aと8A）に挟まれる領域にYQ1が座乗することが明らかになった（図3）。YQ1座乗領域と詳細に特定するために、YQの分離集団（12500個体）を用いて高精度連鎖解析

- 4 -

を行った結果、YQ1 は分子マーカー（4A9 と 20）に挟まれる約 8Kb を特定する事ができた（図 4）。この領域において遺伝子予測を行ったところ、1 個の遺伝子が予測され、相同性検索の結果、CKX(サイトカイニン酸化酵素)と高い相同性を有する遺伝子を見いだした（図 4）。この CKX 遺伝子について、ハバタキと
5 コシヒカリの塩基配列を決定したところ、塩基の違いがみいだされ、ハバタキの CKX は機能を欠失していると思われた（図 5）。

さらに、イネゲノム配列を検索し、イネにおける CKX 遺伝子を解析したところ、イネゲノム中に 11 個の CKX 遺伝子が存在する事が判明した。シロイヌナズナにおける CKX 遺伝子と共に、これらについて遺伝的系統樹を作成した結果、
10 シロイヌナズナの AtCKX2, 3 及び 4 と 5 つのイネ CKX 遺伝子（Chr.1 25cM P695A4 に座乗する CKX, Chr.127 P419B01 に座乗する CKX（本遺伝子）、Chr.6 79cM OsJ0006A22-GS に座乗する CKX 遺伝子、Chr.2 32cM に座乗する 2 つの CKX 遺伝子）が非常に近縁である事が判明した（図 6）。これらの遺伝子の相同性を調べたところアミノ酸レベルで高い相同性を有する事が判明した（図
15 7～9）。また、イネにおけるすべての CKX 遺伝子について座乗位置を確認したところ、いくつかの YQ 領域に座乗することが明らかになった（図 10）。

即ち、本発明者らは、植物の着粒数の増減に関与する新たな遺伝子を単離することに成功し、これにより本発明を完成するに至った。

本発明は、植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）の増減を調節する遺伝子の単離・同定、並びに該遺伝子を利用した植物の着粒数（穎花・果実・種子を含む）を増加させる育種方法に関し、以下の〔1〕～〔19〕を提供するものである。
20

〔1〕 その機能の欠失により植物の着粒数を増加させる植物由来のタンパク質をコードする、下記（a）から（d）のいずれかに記載の DNA。

25 （a）配列番号：3 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

5 (d) 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

[2] イネ由来である、[1]に記載のDNA。

[3] [1] または [2] に記載のDNAの転写産物と相補的なRNAをコードするDNA。

10 [4] [1] または [2] に記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA。

[5] 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、[1] または [2] に記載のDNAの発現を抑制させるRNAをコードするDNA。

[6] [1] から [5] のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

15 [7] [6] に記載のベクターが導入された宿主細胞。

[8] [6] に記載のベクターが導入された植物細胞。

[9] [8] に記載の植物細胞を含む形質転換植物体。

[10] [9] に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

20 [11] [9] または [10] に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

[12] [1] から [5] のいずれかに記載のDNAを植物細胞に導入し、該植

物細胞から植物体を再生させる工程を含む、形質転換植物体の製造方法。

〔13〕 〔1〕または〔2〕に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

〔14〕 〔7〕に記載の宿主細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から組換えタンパク質を回収する工程を含む、〔13〕に記載のタンパク質の製造方法。

5 〔15〕 〔13〕に記載のタンパク質に結合する抗体。

〔16〕 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列またはその相補配列に相補的な少なくとも15の連続する塩基を含むポリヌクレオチド。

〔17〕 〔3〕から〔5〕のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させる工程を含む、植物の着粒数を増加させる方法。

10 〔18〕 〔1〕から〔5〕のいずれかに記載のDNA、もしくは〔6〕に記載のベクターを有効成分とする、植物の着粒数を改変する薬剤。

〔19〕 植物の着粒数を判定する検査方法であって、

(a) 被検植物体またはその繁殖媒体からDNA試料を調製する工程、

(b) 該DNA試料から〔1〕に記載のDNA領域を増幅する工程、

15 (c) 増幅されたDNA領域の塩基配列を決定する工程、

を含み、該塩基配列がその機能の欠失により植物の着粒数を増加させるタンパク質をコードしている場合に、着粒数が少ない品種であると判断し、該タンパク質をコードしていない場合に、着粒数が多い品種であると判断する方法。

20 本発明は、イネ由来のCKXタンパク質をコードするDNAを提供する。「コシヒカリ」のゲノムDNAの塩基配列を配列番号：1に、「コシヒカリ」のcDNAの塩基配列を配列番号：2に、該DNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配

- 7 -

列番号：3に示す。また、「ハバタキ」のゲノムDNAの塩基配列を配列番号：4に、「ハバタキ」のcDNAの塩基配列を配列番号：5に、該DNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。

本発明により単離されたCKX遺伝子は「ハバタキ」と「コシヒカリ」の交雑後代を利用して検出された量的形質遺伝子座（QTL）の一つであり、第1染色体上に座乗することが明らかとなった。また、このCKX遺伝子について、ハバタキとコシヒカリの塩基配列を決定したところ、塩基の違いが見出され、コシヒカリ等の他の品種に比べ着粒数が多いハバタキのCKXタンパク質は機能を欠失していることがわかった。

10 植物ホルモンの1つサイトカイニン（カイネチンと同様な生理活性を有する化合物群で、アデニンの6位に置換基を持つものの総称）は、細胞分裂促進、花芽形成、側芽形成、老化抑制、気孔の開閉、根の伸長促進等に関与している。特に花芽形成、側芽形成の促進は本形質（穎花数の増加）と密接に連鎖していると言える。サイトカイニンはメバロン酸を基質として4つの触媒反応を通して合成されるが、サイトカイニン酸化酵素によってアデニンの6位が切断され不活性化される（ゼアチンの場合はアデニンとメチルプテナルに分解）。つまり、CKX（サイトカイニン酸化酵素）遺伝子の機能欠損は、サイトカイニンを分解する事ができず、結果的にサイトカイニンを蓄積することになる。サイトカイニンの蓄積は花芽形成誘導を行うので、着粒数（穎花数）の増加につながると考えられCKX遺伝子はその機能と表現型に非常に合致する。以上の結果から、CKX遺伝子の機能欠失は、イネの着粒数（穎花数）を上昇させ、結果収量を増加させることがわかる。これまで、着粒数（穎花数）の増加につながると考えられる遺伝子については、同定および単離には至っていなかった。本発明者らは、複雑なステップを経て遂にその存在領域を解明し、単一の遺伝子として該遺伝子を単離することに初めて成功した。

現在、日本のイネの品種改良においては、着粒数の増加は重要な育種目標である。着粒数の増加は、そのまま穀類の収量を増加させる形質に繋がり、それらの形質は農業的に極めて重要な形質であるため、CKX遺伝子を用いた育種への応用が期待されている。

- 5 CKX遺伝子の機能欠失は、植物の着粒数を上昇させることから、アンチセンス法、リボザイム法等を利用して該DNAの発現制御を行うことにより、結果的に穀物の収量を増加させることが可能である。例えば、CKX遺伝子が機能している品種、例えば「コシヒカリ」に、アンチセンス方向にCKX遺伝子を導入することにより、着粒数を増加させることができる。また、分子マーカを用いて不活性型
- 10 CKX遺伝子を導入し、着粒数を増加させることができる。導入方法は形質転換であっても、交配であってもよい。形質転換に要する期間は交配による遺伝子移入に比較して極めて短期間であり、他の形質の変化を伴わないで着粒数を増加が可能となる。本発明において単離した、着粒数の増減に関するCKX遺伝子を利用することにより、イネの着粒数を容易に変化させることができ、着粒数が増加した
- 15 イネ品種育成に貢献できると考えられる。また、穀類には、ゲノムシンテニー（遺伝子の相同性）が極めてよく保存されているため、イネCKX遺伝子のコムギ、オオムギ、トウモロコシなどの穀物育種への応用が期待できる。さらに、穀類のみならず、CKX遺伝子は植物に広く分布することから、CKX遺伝子の機能欠失は全ての植物で花・種子（穎花）数を増加させ、収量の増加を導くと考え
- 20 られる。

- 本発明のCKXタンパク質をコードするDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、該CKX遺伝子を有するイネ品種（例えば、「コシヒカリ」）からゲノムDNA
- 25 を抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、

- 9 -

コスミド、BAC、PACなどが利用できる)を作成し、これを展開して、本発明タンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号:1もしくは2)を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明

5 タンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号:1もしくは2)に特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRをおこなうことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、CKX遺伝子を有するイネ品種(例えば、「コシヒカリ」)から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、

10 上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

本発明は、配列番号:3に記載のCKXタンパク質(「コシヒカリ」)と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを包含する。ここで「CKXタンパク質

15 と同等の機能を有する」とは、対象となるタンパク質の機能を欠失させることにより、着粒数を増加させる機能を有することを指す。このようなDNAは、好ましくは単子葉植物由来であり、より好ましくはイネ科植物由来であり、最も好ましくはイネ由来である。

このようなDNAには、例えば、配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1

20 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする変異体、誘導体、アレル、バリエーションおよびホモログが含まれる。

アミノ酸配列が改変されたタンパク質をコードするDNAを調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis法(Kramer,

25 W.& Fritz,H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis

- 10 -

via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology, 154: 350-367) が挙げられる。

また、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは、自然界においても生じ得る。このように天然型のCKXタンパク質をコードするアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAであっても、天然型のCKXタンパク質（配列番号：3）と同等の機能を有するタンパク質をコードする限り、本発明のDNAに含まれる。また、たとえ、塩基配列が変異した場合でも、それがタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）もあり、このような縮重変異体も本発明のDNAに含まれる。

10 配列番号：3に記載のCKXタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術（Southern, E.M. (1975) Journal of Molecular Biology, 98, 503）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術（Saiki, R. K. et al. (1985) Science, 230, 1350-1354, Saiki, R. K. et al. (1988) Science, 239, 487-491）を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者にとっては、CKX遺伝子の塩基配列（配列番号：2）もしくはその一部をプローブとして、またCKX遺伝子（配列番号：2）に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネや他の植物からCKX遺伝子と高い相同性を有するDNAを単離することは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離するCKXタンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAもまた本発明のDNAに含まれる。

このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジেন্টな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件とは、6M尿素、0.4%SDS、0.5xSSCの条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリン

- 11 -

ジェンシーの高い条件、例えば、6M尿素、0.4%SDS、0.1xSSCの条件を用いることにより、より相同性の高いDNAの単離を期待することができる。これにより単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、CKXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号：3または6）と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、

- 5 アミノ酸配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%,96%,97%,98%,99%以上）の配列の同一性を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993）を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている
- 10 （Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990）。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。
- 15

- あるDNAが植物の着粒数の増減に関するタンパク質をコードするか否かは以下のようにして評価することができる。最も一般的な方法としては、該DNAの機能を欠失させた上で栽培を行い、着粒数を調べる手法である。すなわち該DNAの機能を保った条件と該DNAの機能を欠失させた条件で栽培し、着粒数を比較する方法である。着粒数が変わらないかほとんど同じ場合は、該DNAは着粒数の増減に関与しないと判断する。該DNAが着粒数の増減に関する場合は、着粒数はより増加し、その差を着粒数の増減の程度とみなすことができる。
- 20

- 本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製や着粒数が改変された形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。組み換えタンパク質を調
- 25

- 1 2 -

製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。

- 5 例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用する
- 10 ことが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A. (1970)
- 15 Journal of Molecular Biology, 53, 158-162、Hanahan, D. (1983) Journal of Molecular Biology, 166, 557-580）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することが可能である。組み換えタンパク質を上記のマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、
- 20 容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。また、後述する手法で、本発明のDNAが導入された形質転換植物体を作成し、該植物体から本発明のタンパク質を調製することも可能である。従って、本発明の形質転換植物体には、後述する、着粒数を改変するために本発明のDNAが導入された植物体のみならず、本発明のタンパク質の調製のために本発明のDNAが導入された植物体も含まれる。

- 25 得られた組換えタンパク質を用いれば、これに結合する抗体を調製することが

- 13 -

できる。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去することにより調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞
5 と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明には、本発明のタンパク質に結合する抗体が含まれる。これらの抗体を用いることにより、植物体における着粒数の増減に關与する
10 タンパク質の発現部位の判別、もしくは植物種が着粒数の増減に關与するタンパク質が発現するか否かの判別を行うことが出来る。

例えば、着粒数が少ない「コシヒカリ」のカルボキシル末端側のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、着粒数が多い「ハバタキ」等の品種において発現するタンパク質には結合しないため、植物種内において着粒数の増減に關与するタンパク質が発現するかいなかを判別する際に用いることができる。
15

本発明のDNAを利用して着粒数が増加した形質転換植物体を作製する場合には、本発明のタンパク質をコードするDNAの発現を抑制するためのDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。ベクターを導入する植物細胞としては、本発明のDNAが正常
20 に発現している植物細胞であることが好ましい。「本発明のタンパク質をコードするDNAの発現を抑制」には、遺伝子の転写の抑制およびタンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、DNAの発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

植物における特定の内在性遺伝子の発現の抑制は、例えば、本発明のタンパク
25 質をコードするDNAの転写産物と相補的なRNAをコードするDNAを利用して行

なうことができる。

「本発明のタンパク質をコードするDNAの転写産物と相補的なRNAをコードするDNA」の一つの態様は、本発明のタンパク質をコードするDNAの転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAである。植物細胞におけるアンチセンス効果は、エッカーらが一時的遺伝子発現法を用いて、電気穿孔法で導入したアンチセンスRNAが植物においてアンチセンス効果を発揮することで初めて実証した(J.R.Ecker and R.W.Davis, (1986) Proc.Natl.Acad.USA.83:5372)。その後、タバコやペチュニアにおいても、アンチセンスRNAの発現によって標的遺伝子の発現を低下させる例が報告されており(A.R.van der Krol et al. (1988) Nature 333:866)、現在では植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子

の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的で
5 あろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された
10 DNAは、公知の方法で、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用
15 いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNA の長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して
20 行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもある
25 が、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメイ

ンを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている

- 5 (M.Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA 配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、 M.Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids
10 Res. 17:7059)。例えば、CKX遺伝子のコード領域(配列番号: 2)中には標的となりうる部位が複数存在する。

- また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、
15 標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi and N.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、 菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

- 標的を切断できるよう設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるよう
にカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび
20 転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K.Taira
25 et al. (1990) Protein Eng. 3:733、 A.M.Dzianottand J.J.Bujarski (1989)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:4823、 C.A.Grosshans and R.T.Cech (1991)

Nucleic Acids Res. 19:3875、 K.Taira et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5125).

また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyama et al.

- 5 Biochem.Biophys.Res.Comm.186:1271,1992)。このようなりボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

- 「本発明のタンパク質をコードするDNAの転写産物と相補的なRNAをコードするDNA」の他の一つの態様は、本発明のタンパク質をコードするDNAの転写産物と相補的なdsRNAをコードするDNAである。RNAiは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNA（以下dsRNA）を細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象である。細胞に約40～数百塩基対のdsRNAが導入されると、ヘリカーゼドメインを持つダイサー(Dicer)と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、
- 15 dsRNAを3'末端から約21～23塩基対ずつ切り出し、siRNA（short interference RNA）を生じる。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、ヌクレアーゼ複合体（RISC：RNA-induced silencing complex）が形成される。この複合体はsiRNAと同じ配列を認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部で標的遺伝子のmRNAを切断する。また、この経路とは別にsiRNAのアンチ
- 20 センス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ(RsRP)のプライマーとして作用し、dsRNAが合成される。このdsRNAが再びダイサーの基質となって、新たなsiRNAを生じて作用を増幅する経路も考えられている。

- 上記RNAiは、当初、線虫において発見されたが（Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis*
- 25 *elegans*. Nature 391, 806-811, (1998))、現在では、線虫のみならず、植物、線

形動物、ショウジョウバエ、原生動物などの種々の生物において観察されている
(Fire, A. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet. 15, 358-363 (1999)、
Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001)、
Hammond, S. M., Caudy, A. A. & Hannon, G. J. Post-transcriptional gene
5 silencing by double-stranded RNA. Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001)、
Zamore, P. D. RNA interference: listening to the sound of silence. Nat Struct
Biol. 8, 746-750 (2001))。これら生物では、実際に外来よりdsRNAを導入する
ことにより標的遺伝子の発現が抑制されることが確認され、さらにはノックアウト
ト個体を創生する方法としても利用されつつある。

- 10 RNAiの登場当初はdsRNAはある程度の長さ(40塩基)以上でなければ効果がない
と考えられていたが、米ロックフェラー大のTuschlらは21塩基対前後の単鎖
dsRNA(siRNA)を細胞に導入すれば、哺乳動物細胞においてもPKRによる抗ウイル
ス反応を起こさず、RNAiの効果があることを報告し (Tuschl, Nature, 411,
494-498(2001))、RNAiは分化したヒトなどの哺乳動物細胞に応用可能な技術と
15 して俄然注目を集めることになった。

本発明のDNAは、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンス
RNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、前記標的遺伝子mRNAのいずれ
かの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAを含み、前記アンチセンス
コードDNAおよび前記センスコードDNAより前記アンチセンスRNAおよび前記
20 センスRNAを発現させることができる。また、これらのアンチセンスRNAおよび
センスRNAよりdsRNAを作成することもできる。

本発明のdsRNAの発現システムを、ベクター等に保持させる場合の構成として
は、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合と、異
なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合があ
25 る。例えば、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構

成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA (siRNAコードDNA) が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモータを対向して備えられる。

5 この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖 (アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖) の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A (アデニン) 塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロ

10 モーターの種類を異ならせることが好ましい。

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセ

20 ットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

本発明のRNAiにおいては、dsRNAとしてsiRNAが使用されたものであってもよい。「siRNA」は、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、Tuschlら (前掲) により報告された全長21~23塩基対に限定されるものではなく、毒性を示さない範囲の長さであれば特に限定はなく、例えば、15~49

25 塩基対と、好適には15~35塩基対と、さらに好適には21~30塩基対とすることが

- 20 -

できる。あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分の長さが、例えば、15～49塩基対、好適には15～35塩基対、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。

本発明のDNAとしては、標的配列のインバーテッドリピートの間に適当な配列
5 (イントロン配列が望ましい) を挿入し、ヘアピン構造を持つダブルストランドRNA(self-complementary 'hairpin' RNA(hpRNA))を作るようなコンストラクト (Smith, N.A. et al. Nature, 407:319, 2000、Wesley, S.V. et al. Plant J. 27:581, 2001、Piccin, A. et al. Nucleic Acids Res. 29:E55, 2001) を用いることもできる。

- 10 RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。また、配列の同一性は上述した手法により決定できる。

- 15 dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ (対応する塩基が相補的でない)、バルジ (一方の鎖に対応する塩基がない) などにより不對合部分が含まれていてもよい。本発明においては、dsRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよい。

- 20 内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAの形質転換によってもたらされる共抑制によっても達成される。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr.Biol.7:R793,1997,

- 21 -

Curr.Biol.6:810,1996)。例えば、CKX遺伝子が共抑制された植物体を得るためには、CKX遺伝子若しくはこれと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターDNAを目的の植物へ形質転換し、得られた植物体からCKX変異体の形質を有する植物、即ち感光性が低下した植物を選択すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも
5 70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%,96%,97%,98%,99%以上）の配列の同一性を有する。

さらに、本発明における内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子のドミナントネガティブの形質を有する遺伝子を植物へ形質転換することによっても達成することができる。ドミナントネガティブの形質を有する遺伝子とは、該遺伝子を
10 発現させることによって、植物体が本来持つ内在性の野生型遺伝子の活性を消失もしくは低下させる機能を有する遺伝子のことをいう。

また、本発明は、上記本発明のDNAや本発明のDNAの発現を抑制するDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、組み換えタンパク
15 質の生産に用いる上記したベクターの他、形質転換植物体作製のために植物細胞内で本発明のDNAあるいは本発明のDNAの発現を抑制するDNAを発現させるためのベクターも含まれる。このようなベクターとしては、植物細胞で転写可能なプロモーター配列と転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列を含んでいれば特に制限されず、例えば、プラスミド

「pBI121」、「pBI221」、「pBI101」（いずれもClontech社製）などが挙げられる。植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。ここ
25

- 22 -

でいう「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

本発明のベクターは、本発明のタンパク質を恒常的または誘導的に発現させるためのプロモーターを含有しうる。恒常的に発現させるためのプロモーターとして、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター (Odell et al. 1985 Nature 313:810)、イネのアクチンプロモーター (Zhang et al. 1991 Plant Cell 3:1155)、トウモロコシのユビキチンプロモーター (Cornejo et al. 1993 Plant Mol. Biol. 23:567) などが挙げられる。

また、誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば糸状菌・細菌・ウイルスの感染や侵入、低温、高温、乾燥、紫外線の照射、特定の化合物の散布などの外因によって発現することが知られているプロモーターなどが挙げられる。このようなプロモーターとしては、例えば、糸状菌・細菌・ウイルスの感染や侵入によって発現するイネキチナーゼ遺伝子のプロモーター (Xu et al. 1996 Plant Mol. Biol. 30:387) やタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーター (Ohshima et al. 1990 Plant Cell 2:95)、低温によって誘導されるイネの「lip19」遺伝子のプロモーター (Aguan et al. 1993 Mol. Gen. Genet. 240:1)、高温によって誘導されるイネの「hsp80」遺伝子と「hsp72」遺伝子のプロモーター (Van Breusegem et al. 1994 Planta 193:57)、乾燥によって誘導されるシロイヌナズナの「rab16」遺伝子のプロモーター (Nundy et al. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1406)、紫外線の照射によって誘導されるパセリのカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター (Schulze-Lefert et al. 1989 EMBO J. 8:651)、嫌気的条件下で誘導されるトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター (Walker et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6624) などが挙げられる。また、イネキチナーゼ遺伝子のプロモーターとタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーターはサリチル酸などの特定の化合物によって、

- 23 -

「rab16」は植物ホルモンのアブシジン酸の散布によっても誘導される。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された形質転換細胞を提供する。本発明のベクターが導入される細胞には、組み換えタンパク質の生産に用いる上記した細胞の他に、形質転換植物体作製のための植物細胞が含まれる。植物細胞としては特に制限はなく、例えば、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、タバコなどの細胞が挙げられる。本発明の植物細胞には、培養細胞の他、植物体中の細胞も含まれる。また、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根も含まれる。植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である（Toki et al. (1995) Plant Physiol. 100:1503-1507参照）。例えば、イネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（インド型イネ品種が適している）を再生させる方法（Datta, S.K. (1995) In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.) pp66-74）、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（日本型イネ品種が適している）を再生させる方法（Toki et al. (1992) Plant Physiol. 100, 1503-1507）、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法（Christou et al. (1991) Bio/technology, 9: 957-962.）およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法（Hiei et al. (1994) Plant J. 6: 271-282.）など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

形質転換された植物細胞は、再分化させることにより植物体を再生させることが可能である。再分化の方法は植物細胞の種類により異なるが、例えば、イネで

- 24 -

あればFujimuraら (Plant Tissue Culture Lett. 2:74 (1995)) の方法が挙げられ、トウモロコシであればShillitoら (Bio/Technology 7:581 (1989)) の方法やGorden-Kammら (Plant Cell 2:603(1990)) が挙げられ、ジャガイモであればVisserら (Theor.Appl.Genet 78:594 (1989)) の方法が挙げられ、タバコであればNagataとTakebe (Planta 99:12(1971)) の方法が挙げられ、シロイヌナズナであればAkamaら (Plant Cell Reports12:7-11 (1992)) の方法が挙げられ、ユーカリであれば土肥ら (特開平8-89113号公報) の方法が挙げられる。

一旦、ゲノム内に本発明のDNAあるいは本発明のDNAの発現を抑制するDNAが導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料 (例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等) を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクロンの繁殖材料が含まれる。

このようにして作出された着粒数が改変された植物体は、野生型植物体と比較して、その着粒数および収量に変化している。例えば、アンチセンスDNAなどの導入によりCKXタンパク質をコードするDNAの発現が抑制された植物体は、その着粒数の増加により、収量の増加が期待される。本発明の手法を用いれば、有用農作物であるイネにおいては、その着粒数を増加することができ、収量が増加したイネ品種の育成の上で非常に有益である。

また、本発明は、配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列またはその相補配列に相補的な少なくとも15の連続する塩基を含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補配列」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖の配列に対する他方の鎖の配列を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連

- 25 -

続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列の同一性を有すればよい。このようなDNAは、本発明のDNAの検出や単離を行なうためのプローブとして、また、増幅を行なうためのプライマーとして有用である。

さらに、本発明は、植物の着粒数の増減を判定する遺伝子診断方法を提供する。植物の着粒数は植物の収穫量に密接に係わり、植物の着粒数を判定することは収穫量の増大を目的としたイネ品種育成において非常に重要なことである。

本発明において「植物の着粒数の増減を判定」とは、これまでに栽培されていた品種における着粒数の増減の判定のみならず、交配や遺伝子組換え技術による新しい品種における着粒数の増減の判定も含まれる。

本発明の植物の着粒数の増減を評価する方法は、植物がCKXタンパク質をコードするDNAの機能を欠失しているか否かを検出することを特徴とする。植物がCKXタンパク質をコードするDNAの機能を欠失しているか否かは、ゲノムDNAのCKX遺伝子に相当する塩基配列の違いを検出することにより評価することが可能である。

本発明のDNAに相当する被検植物体のDNA領域の塩基配列を直接決定し、該塩基配列がその機能の欠失により植物の着粒数を増加させるタンパク質をコードしている場合には、着粒数が少ない品種であると判定し、該タンパク質をコードしていない場合には、着粒数が多い品種であると判定する。

例えば、イネのCKXタンパク質の機能を欠失させる変異が被検植物のDNAの塩基配列に見出されれば、この被検植物は着粒数が多い品種であると診断される。

本発明の方法による植物の着粒数の増減の評価は、例えば、植物の交配による

品種改良を行なう場合において利点を有する。例えば、着粒数を増加させる形質の導入を望まない場合に、着粒数を増加させる性質を有する品種との交配を避けることができ、逆に、着粒数を増加させる形質の導入を望む場合に、着粒数を増加させる性質を有する品種との交配を行うことができる。また交雑後代個体から望ましい個体を選抜する際にも有効である。植物の着粒数の増減を、その表現型により判断することに比して、遺伝子レベルで判断することは簡便で確実であるため、本発明の着粒数の増減の評価方法は、植物の品種改良において大きく貢献し得る。

10 図面の簡単な説明

図1は、コシヒカリおよびハバタキの表現型を示す写真である。左側がコシヒカリ、右側がハバタキを示す。

図2は、Yielding QTL(YQ)の染色体における位置を示す図である。

図3は、Yielding QTL(YQ)の小規模連鎖MAPを示す図である。

15 図4は、Yielding QTL(YQ)の高精度連鎖MAPを示す図である。

図5は、コシヒカリとハバタキのYielding QTL(YQ)の高精度連鎖MAPの比較を示す図である。

図6は、シロイヌナズナとイネのCKX遺伝子の系統樹を示す図である。

図7は、各CKX遺伝子の配列を比較した図である。

20 図8は、図7の続きを示す図である。

図9は、図8の続きを示す図である。

図10は、イネにおけるすべてのCKX遺伝子の座乗位置を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕 試験材料の選定および準同質遺伝子系統の作製

QTL 解析を行う雑種集団の育成に先駆け、雑種集団の親となる品種の選定を試みた。まず、日本型イネ・数品種、インド型イネ・数品種の平均着粒数を調査し、両品種間で着粒数に明瞭な差が見られた日本型イネの「コシヒカリ」とインド型イネ「ハバタキ」2つの品種を選抜した（図 1）。日本型品種「コシヒカリ」に
5 イネ「ハバタキ」を交雑した F1 個体に、コシヒカリを反復親とした戻し交雑と自殖を行い、74 系統の BC2F1, BC2F2 および BC3F2 の集団を育成後、名古屋大学附属農場に展開した。

BC2F2 74 個体を用いて、着粒数に関する QTL 解析を行った結果、着粒数を
10 増加させる複数の QTL を検出した（図 2）。特に第 1 染色体短腕約 28cM 近傍にハバタキの locus がコシヒカリに対して着粒数を増加させる効果の大きい

QTL(YQ1; Yielding QTL 1)を見いだすことに成功した（図 2）。YQ1 の存在を検証するために、返し戻し交雑と MAS を用いて、YQ1 準同質遺伝子系統（Nil-YQ1:コシヒカリの染色体にハバタキの第 1 染色体約 28cM 近傍が置換した系統）
15 を作製した。Nil-YQ1 及びコシヒカリ（コントロール）の最大着粒数を調査し、QTL(YQ1)の存在を確認した。第 1 染色体短腕、約 28cM 近傍がハバタキに置換した系統は平均で 50 粒着粒数を増加させた。

〔実施例 2〕 QTL 解析

74 個体の BC2F1 からそれぞれ CTAB 法を用いて DNA を抽出すると共全染色体を網羅的に包含する 93 個の分子マーカーを用いて各個体の遺伝子型を決定した。
20 その自殖後代 BC2F2 を 1 系統に各 10 個体展開し、その中から、ランダムに 1 系統に 1 個体を選定し、選定した個体についてそれぞれ 6 穂をサンプリング後、各穂の着粒数を調査した。各系統 6 穂の内、最も着粒数の多かった穂を選出し、最大着粒数とした。Qgene ソフトを用いて QTL 解析を行った。

〔実施例 3〕 YQ の分離集団を用いた高精度連鎖解析

BC3F2 集団を用いて、分子マーカーによる遺伝子型と表現型（F2 及び F3）を

- 28 -

調査し、再度連鎖解析を行った。その結果分子マーカー（6A と 8A）に挟まれる領域に YQ1 が座乗することが明らかになった（図 3）。YQ1 座乗領域を詳細に特定するために、YQ の分離集団（12500 個体）を用いて高精度連鎖解析を行った結果、YQ1 は分子マーカー（4A9 と 20）に挟まれる約 8Kb を特定する事ができた（図 4）。この領域において遺伝子予測を行ったところ、1 個の遺伝子が予測され、相同性検索の結果、CKX(サイトカイニン酸化酵素)と高い相同性を有する遺伝子を見いだした（図 4）。この CKX 遺伝子について、ハバタキとコシヒカ리의塩基配列を決定したところ、塩基の違いがみいだされ、ハバタキの CKX は機能を欠失していると思われた（図 5）。

10 〔実施例 4〕 イネゲノムにおける CKX 遺伝子の解析

またイネゲノム配列を検索し、イネにおけるCKX遺伝子を解析したところ、イネゲノム中に11ヶのCKX遺伝子が存在する事が判明した。シロイヌナズナにおけるCKX遺伝子と共に、これらについて遺伝的系統樹を作成した結果、シロイヌナズナのAtCKX2, 3 及び4と5つのイネCKX遺伝子（Chr.1 25cM P695A4に座乗するCKX, Chr.127 P419B01に座乗するCKX（本遺伝子）、Chr.6 79cM OsJ0006A22-GSに座乗するCKX遺伝子、Chr.2 32cMに座乗する2つのCKX遺伝子）が非常に近縁である事が判明した（図 6）。これらの遺伝子の相同性を調べたところアミノ酸レベルで高い相同性を有する事が判明した（図 7～9）。また、イネにおけるすべてのCKX遺伝子について座乗位置を確認したところ、いくつかのYQ領域に座乗することが明らかになった（図 10）。

産業上の利用の可能性

本発明により提供された CKX 遺伝子の機能欠失は、植物の着粒数を上昇させることから、アンチセンス法、リボザイム法等を利用して該 DNA の発現制御を行うことにより、結果的に穀物の収量を増加させることが可能である。穀類には、

- 29 -

ゲノムシンテニー（遺伝子の相同性）が極めてよく保存されているため、イネCKX遺伝子のコムギ、オオムギ、トウモロコシなどの穀物育種への応用が期待できる。さらに、穀類のみならず、CKX遺伝子は植物に広く分布することから、CKX遺伝子の機能欠失は全ての植物で花・種子（穎花）数を増加させ、収量の

5 増加を導くと考えられる。

さらに、本発明は、植物の着粒数の増減を判定する遺伝子診断方法を提供する。植物の着粒数の増減を、その表現型により判断することに比して、遺伝子レベルで判断することは簡便で確実であるため、本発明の着粒数の増減の評価方法は、植物の品種改良において大きく貢献し得る。

- 30 -

請求の範囲

1. その機能の欠失により植物の着粒数を増加させる植物由来のタンパク質をコードする、下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。

(a) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

5 (b) 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

10 (d) 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

2. イネ由来である、請求項1に記載のDNA。

3. 請求項1または2に記載のDNAの転写産物と相補的なRNAをコードするDNA。

15 4. 請求項1または2に記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA。

5. 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、請求項1または2に記載のDNAの発現を抑制させるRNAをコードするDNA。

6. 請求項1から5のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

7. 請求項6に記載のベクターが導入された宿主細胞。

20 8. 請求項6に記載のベクターが導入された植物細胞。

9. 請求項8に記載の植物細胞を含む形質転換植物体。

- 31 -

10. 請求項9に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

11. 請求項9または10に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

12. 請求項1から5のいずれかに記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む、形質転換植物体の製造方法。

13. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

14. 請求項7に記載の宿主細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から組換えタンパク質を回収する工程を含む、請求項13に記載のタンパク質の製造方法。

10 15. 請求項13に記載のタンパク質に結合する抗体。

16. 配列番号：1もしくは2に記載の塩基配列またはその相補配列に相補的な少なくとも15の連続する塩基を含むポリヌクレオチド。

17. 請求項3から5のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させる工程を含む、植物の着粒数を増加させる方法。

15 18. 請求項1から5のいずれかに記載のDNA、もしくは請求項6に記載のベクターを有効成分とする、植物の着粒数を改変する薬剤。

19. 植物の着粒数を判定する検査方法であって、

(a) 被検植物体またはその繁殖媒体からDNA試料を調製する工程、

(b) 該DNA試料から請求項1に記載のDNA領域を増幅する工程、

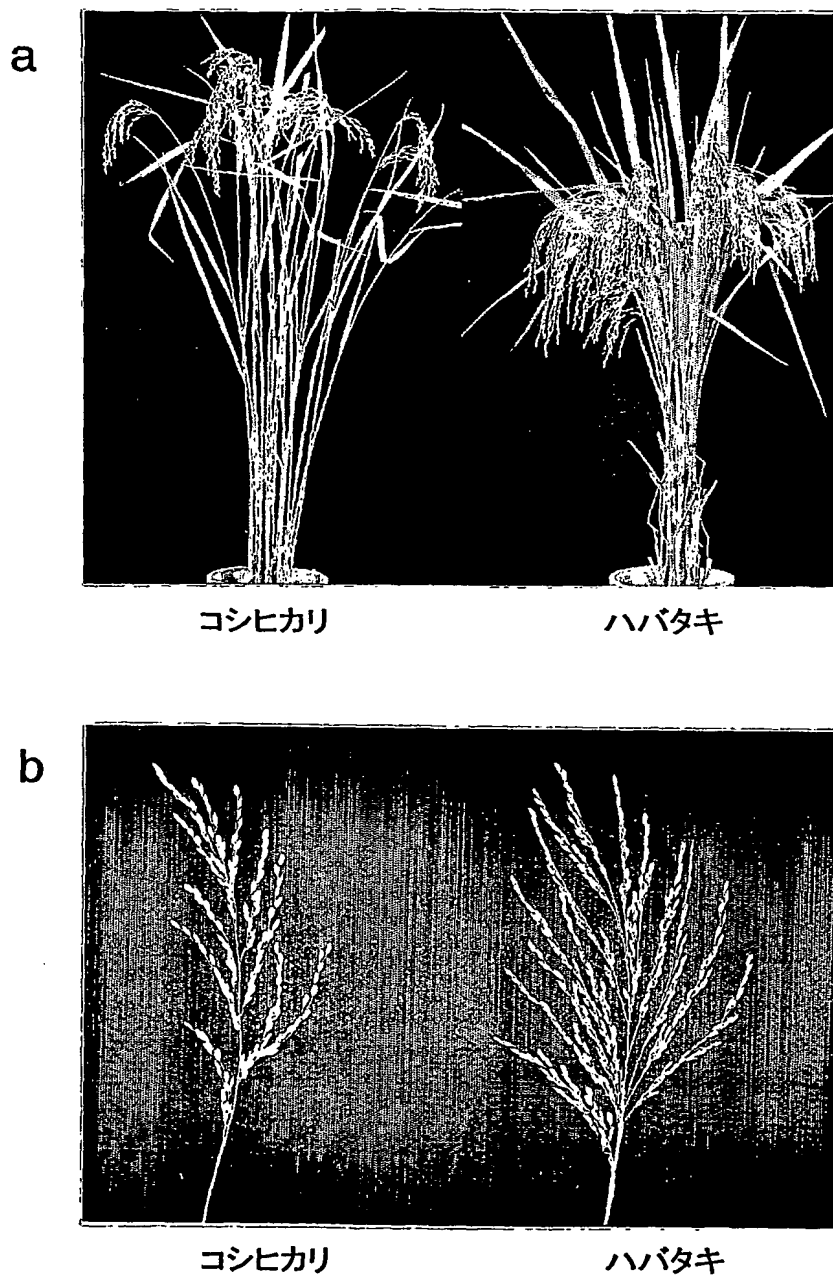
20 (c) 増幅されたDNA領域の塩基配列を決定する工程、

を含み、該塩基配列がその機能の欠失により植物の着粒数を増加させるタンパク

- 3 2 -

質をコードしている場合に、着粒数が少ない品種であると判断し、該タンパク質をコードしていない場合に、着粒数が多い品種であると判断する方法。

図 1



2 / 10

図 2

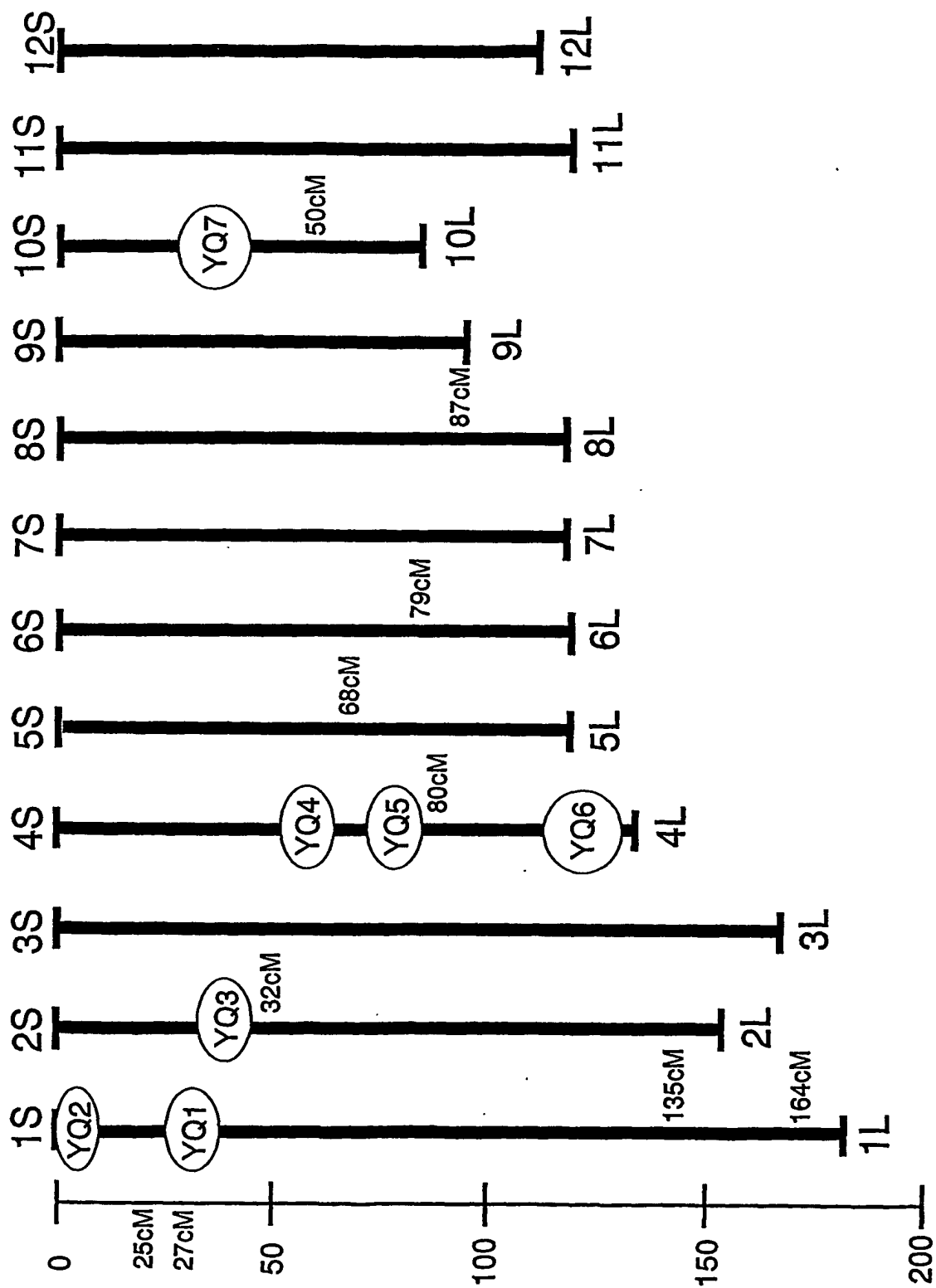
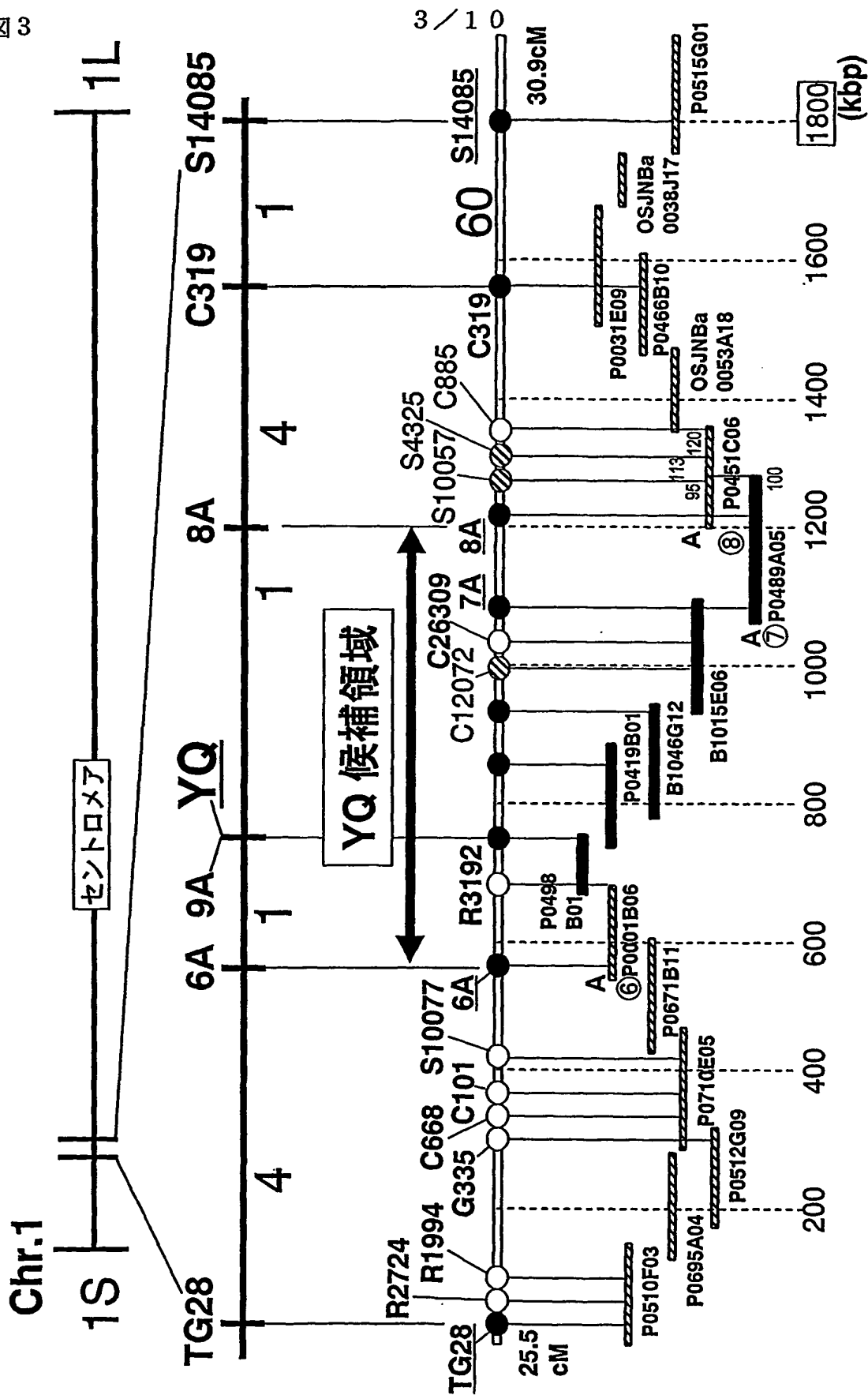


図 3



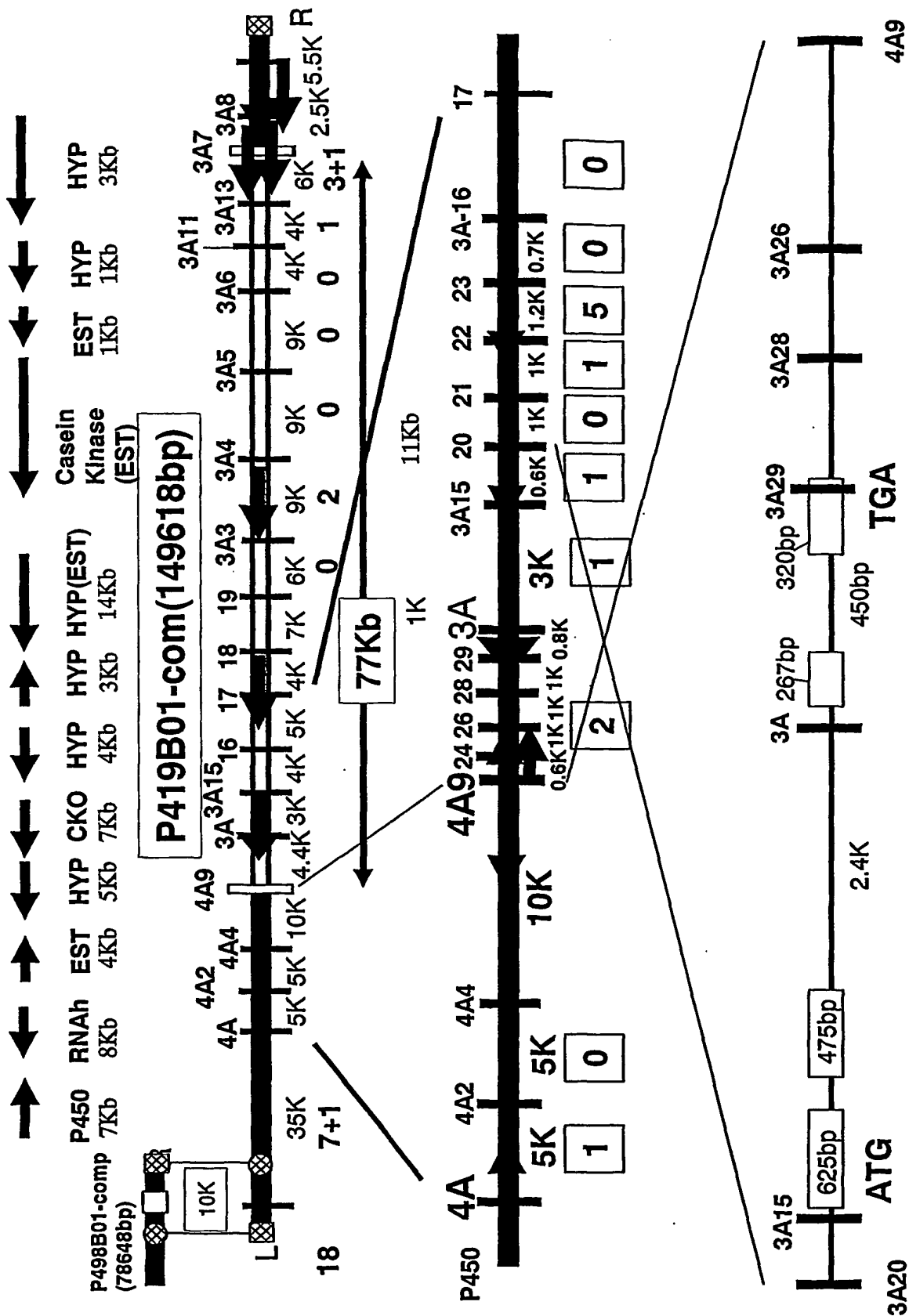
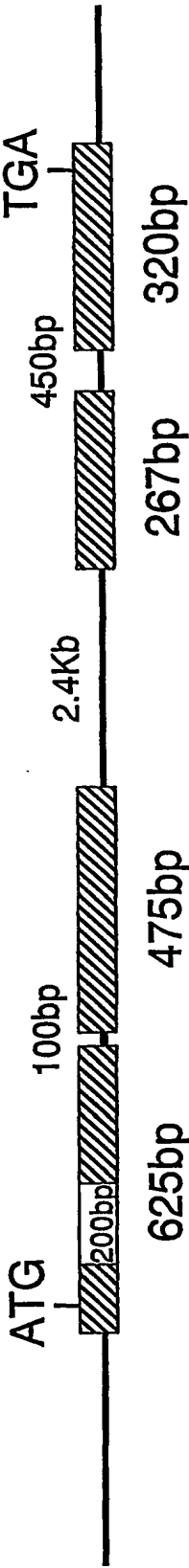


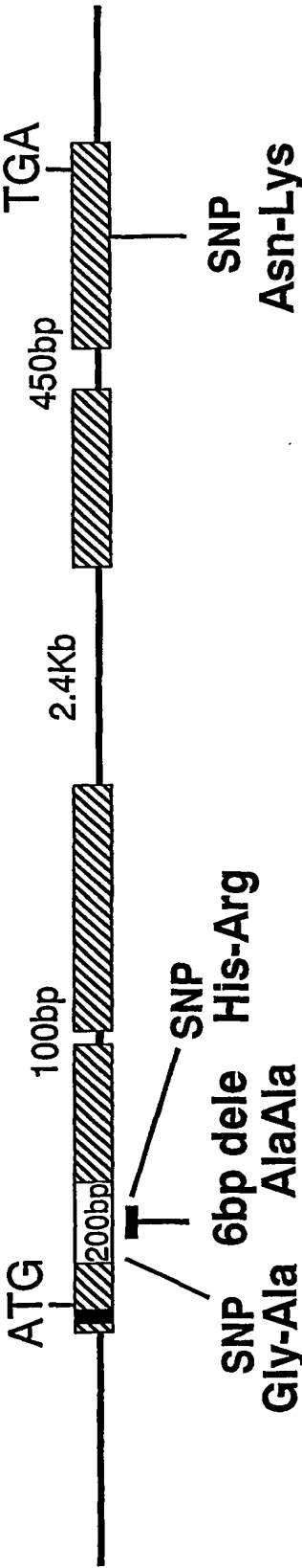
図 5

5 / 10

コシヒカリ

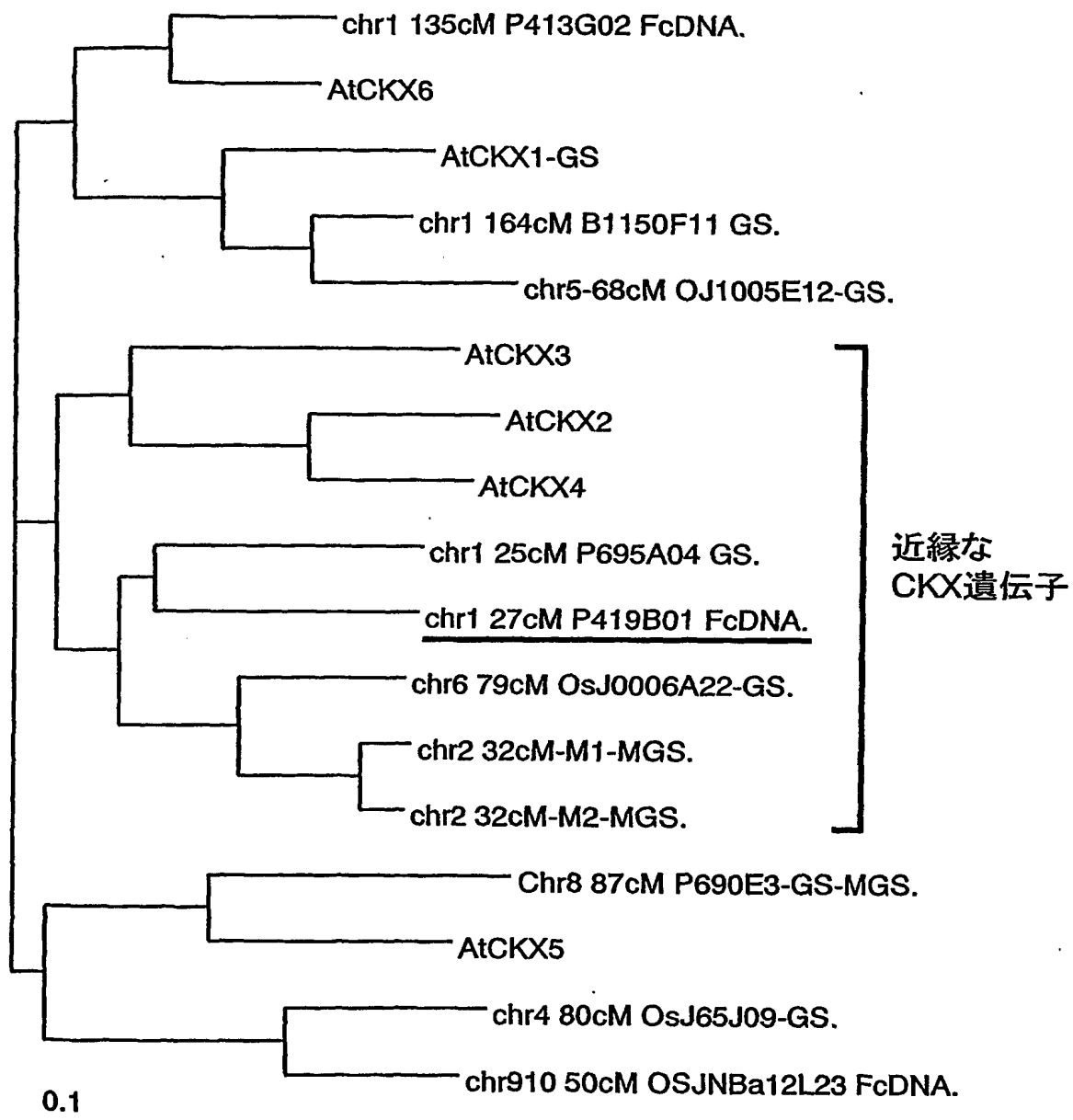


ハバタキ



6/10

図 6



7/10

7

AtCKX2	1	-----MANLALM-ITLITVLMITKSSNGIKID-----PKSLNITLSTDPBI	41
AtCKX3	1	-----MASYNLRSQVRLIAITIVITLSTPITNTSPQPWNI SHNEFAGKLTSSBS	53
AtCKX4	1	-----MTNTLCLSLITLITFFISLTPTLIK--SDEGIDVF--PISLNITVLTDPFS	48
chr1_25cM_P695A04_GS	1	MAAIYL-LIA-ALIASSHALAAHAGGGVPLAARAPLPFPD-----AASGKLR-TOPNAT	54
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	1	MAVL-LML-N-CFVKATAPPWPSSASSASFLDD--L--GD--GIAP--IRADEAGT	48
chr2_32cM-M1-MGS	1	-----MAARCSIA-FMVMASCLSVV--SGG--PG--DFAHSVABK	36
chr2_32cM-M2-MGS	1	-----MAARCSIA-FMIMASCLSVV--SGG--PG--DFAHSVABK	36
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	1	-----MPRAQLTFLIYTSFLSTVPYLAPV--HGG--VTSY-DVSSLDIMBK	44
AtCKX2	42	ISARSH-DFGNI TTVTPGGV CPSSTGDI SALLQYARN--G-KS-----TFQVAAAGQ	90
AtCKX3	54	SVESARTDFGHVTKIFPSAVLIPSSVEDITDLIKLSFDSQL-----S-----PLAARGH	103
AtCKX4	49	ISARSH-DFGNI TDENPBAVLCPSSSTTEVARLLRFANGGFSYNGKSTSPASTFKVAAAGQ	107
chr1_25cM_P695A04_GS	55	VPASMD--FGNITR-----A-LP--AAVLFGSPGSDVRELLRAAYVABGAP--FTVSFRGR	103
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	49	ARASAD--FGNLSVAGVBAPLAARAWLYPSRPADIRALLASCARPA--PFAVSARGC	104
chr2_32cM-M1-MGS	37	LAVDRD-TT-ARASSDFGRIVAAAPERWLPATPAEIRERLVFSASSPS--P--FPVAPAGQ	92
chr2_32cM-M2-MGS	37	LAVDRN-ST-ARASSDFGRIVAAAPERWLPATPAEIRERLVFSASSPS--P--FPVAPAGQ	92
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	45	IHTDHD-AT-TKASSDFGHI VHATPNGV FATTFPADIRAJI ELSLSQDT--P--ETVAPARGK	100
AtCKX2	91	GHS N GQASVS GGV N N TTC TDVV-----VSKOKK--VAVVARGT AVDVLKKTAEK	141
AtCKX3	104	GHS H GQAS KQD V V N N MSV N DRG-- KVSRTCL--VVDVDAAM L E V N K T EL	158
AtCKX4	108	GHS L GQAS APGGV V N TTC A MAAK PAV V ISADGT--VAVVARGTM AVDVLKRAVDRA	164
chr1_25cM_P695A04_GS	104	GHS T GQAL H GGV V V H Q S MG-- GGGAPR NVSADGA--VVDAGGEQL AVDVLRAADAR	159
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	105	GHS V H GQAS APD G V V D V AS G AL Q GGAR AL AVS VEGR--VVDAGGEQL AVDVLRAESMAH	163
chr2_32cM-M1-MGS	93	GHS A RGQSL APGGV V V D V RA A ARAG--RVNVSAGGAGAPVVDAGGEQL ADVLRAHTEH	151
chr2_32cM-M2-MGS	93	GHS A RGQSL APGGV V V D V RA A ARAG--RVNVSAGGAGAPVVDAGGEQL ADVLRAHTEH	148
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	101	GHS S RGQF APGGI V D V SA GDH--GHHTSHR DVSVDAM VVDAGGEQL ADVLHTALKH	159
AtCKX2	142	GVS PVS WTDY L H TVAGT LSN GGI GGQV FAN G P LVENVLELDVITGKGEM TCSAQLNPE	201
AtCKX3	159	GLTPV S WTDY L V TVGGT LSN GGI GGQF FAY BPQ TVN VLELDVITGKGEL ATCSKDMNSD	218
AtCKX4	165	GVS PVT WTDY L V S GGT LSN AGI GGQF FAY BPQ TVN VLELDVITGKGEM TCSKLNPE	224
chr1_25cM_P695A04_GS	160	GVA P S WTDY L H TVGGT LSN AGV SGQF YAH GPQ I SNV LELDVITGHGETVITCSKAVNSD	219
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	164	GLTPV S WTDY L H TVGGT LSN AGI GGQF FAY BPQ I SNV LELDVITGVGETVITCSKEKAPD	223
chr2_32cM-M1-MGS	152	GLAPV V WTDY L R TVAGT LSN AGI GGQF FAY BPQ I ANV LELDVITGRGDMVITCSADKEPD	211
chr2_32cM-M2-MGS	149	GLAPV V WTDY L R TVAGT LSN AGI GGQF FAY BPQ I ANV LELDVITGTGDMVITCSADKDS	208
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	160	GLTPV V WTDY L R TVGGT LSN AGI GGQF FAY BPQ I SNV LELDVITG-----	205

図 8

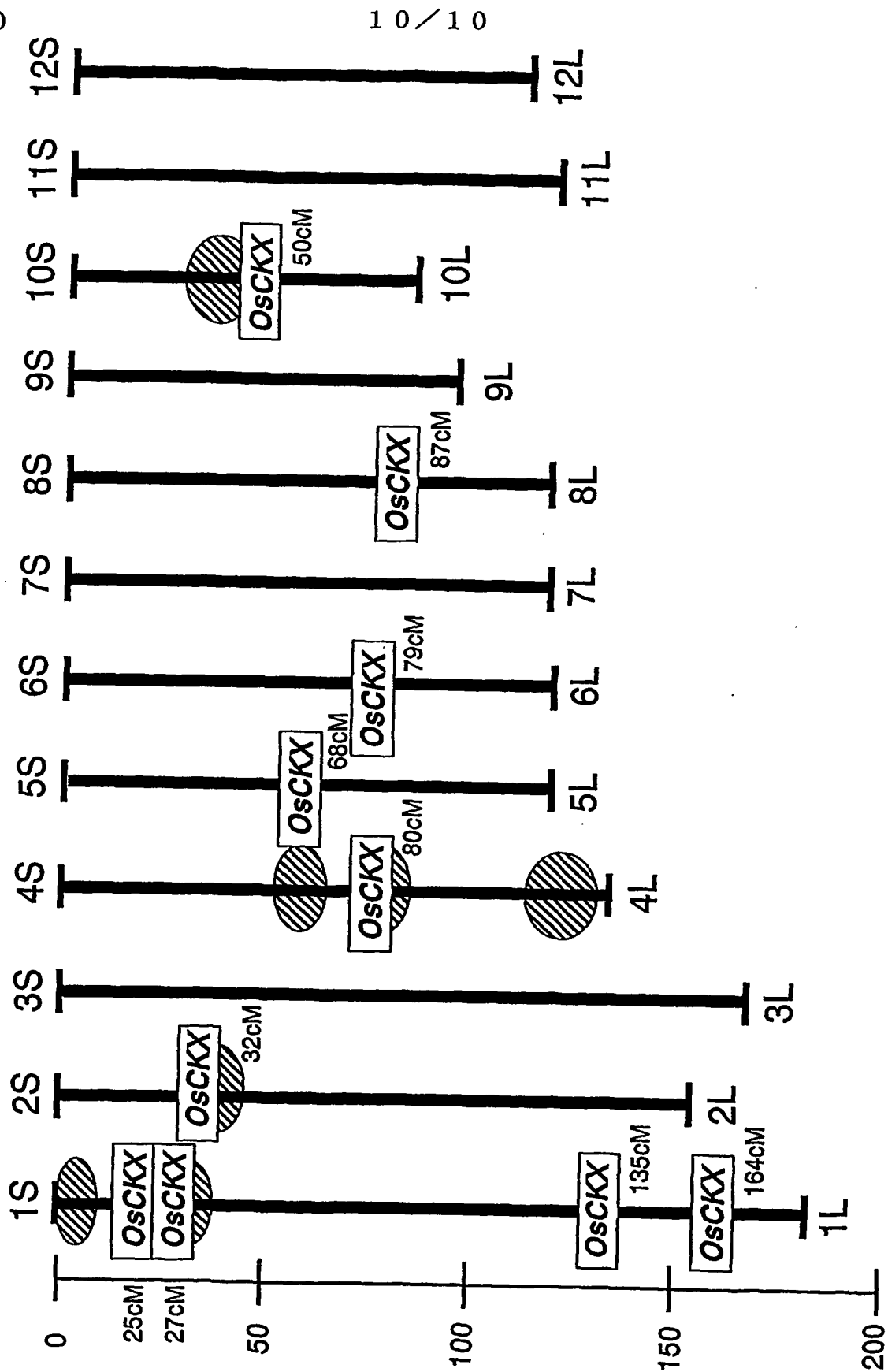
AtCKX2	202	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1261
AtCKX3	219	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	EVAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1276
AtCKX4	225	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1284
chr1_25cM_P695A04_GS	220	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1279
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	224	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1283
chr2_32cM-M1-MGS	212	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1268
chr2_32cM-M2-MGS	209	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1265
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	206	LFYVLGGLGQFGIITRAIRI	DHAPKRAKIFAMLYSDFTTFTKQERLISMANDIGVDY	1255
AtCKX2	262	LEQQIFLSNIVMD	SFFPPSDQSKVADMKQHGII	2296
AtCKX3	277	LEQSIMVDHPPDNWRS	YPPSCLRIASMYKRAHVIY	315
AtCKX4	285	LEQQLMMSNGFMD	SFFPLSDQTRVBSMNDHRII	319
chr1_25cM_P695A04_GS	280	W----	SYVEGAWHGRGIAVALKSSG	324
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	284	VGLMDIVVEGSHNQGL	VEUQTQPPSPSSSSSS	340
chr2_32cM-M1-MGS	269	---SFD---VVEGQWQ	NRT--TEGPKSTP	311
chr2_32cM-M2-MGS	266	---SFD---VVEGQWQ	NRT--TEGPKSTP	308
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	256	---SFD---VVEGQWQ	NRT--TEGPKSTP	299
AtCKX2	297	---VLE---VYKIVYDQPNLP	IIISKVIDTLTKTSVLP	351
AtCKX3	316	CL---	SVYKYVDETQVYNEEMEELSS	369
AtCKX4	320	---VLE---VYKIVYDQPNLP	IIISKVIDTLTKTSVLP	374
chr1_25cM_P695A04_GS	325	V----	YSIEATLNYAANATPSSVDAAVAALGDALHFEES	382
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	341	VLFL	EGAIIFEGGARQPSADVDKAMDVLARELHERGFV	400
chr2_32cM-M1-MGS	312	VIMF	IEGIMVYNESTTASVDQKLTSL	367
chr2_32cM-M2-MGS	309	VIMV	IEGIMVYNESTTASVDQKLTSL	364
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	300	---VLE---VYKIVYDQPNLP	IIISKVIDTLTKTSVLP	355
AtCKX2	352	---RSL---LDEL	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	408
AtCKX3	370	---KSK---QADV	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	426
AtCKX4	375	---RSL---LDEL	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	431
chr1_25cM_P695A04_GS	383	---EKAL---	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	439
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	401	---LRAAL---	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	456
chr2_32cM-M1-MGS	368	ILRSI	GMADVPHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	424
chr2_32cM-M2-MGS	365	YLRSI	GMADVPHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	421
chr6_79cM_OsJ0006A22-GS	356	---RSL---LDEL	PHPLNLFVYKERRIDFANGSWKQII	411

9/10

図 9

AtCKX2	409	RMSRMPEID-EDVIMAI	IBLLQSRTPKDL	P-EVSVNEK	IIR---	FKDS---	GIKIKQYL	461	
AtCKX3	427	RMSRAIPE---	EDVFYAFGE	LSA---	GFONWEAFQDN	MEIKFQEDR	MMGVIDYL	477	
AtCKX4	432	RMSMTMP---	D-EDVFYV	IBLLQSGSQNADEL	ENLNDKVIQ---	FCENS---	GIKIKQYL	483	
chr1_25cM_P695A04_GS	440	RMSAVTPEGEET	WFYVWSL	FBVANDVA	ALERA---	QRRIRFQDLA	GIQVQAYL	492	
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	457	NMSAVITDDGDEW	FYVYVGL	RSRAAR	SDVGRLEF---	QNDIIGFCEVA	GIQVQAYL	511	
chr2_32cM-M1-MGS	425	RMTAVSGNDD---	MFYVWGL	RSRVVP	---	DVERLERENEAV	AFQDNE---	GIQCKQYL	476
chr2_32cM-M2-MGS	422	CMMAVAS---	DDVFYVAVGL	LSRAVIV	---	DVERLEKEENEAV	AFQDNE---	GIQCKQYL	473
chr6_79cM_DsJ0006A22-GS	412	RMTBM-TPD---	EDVFYVAVGL	LSRAVAG	SSGGDVER	QLERENEAV	ELDLAGGE	IGCRQYL	468
AtCKX2	462	MHVT-BKEDMIEH	FGSK	AD-DFSKRKDL	FDPKKL	SPGQDIF	---	501	
AtCKX3	478	PMSSSDEGWAR	FGP-R	AINIFVER	VKY-	DPKMILLSPGQNI	FQKINSS	523	
AtCKX4	484	MHVT-AKEDWKH	FGPK	AD-DFLAK	KIMFDPKAL	SPGQDIFN	---	524	
chr1_25cM_P695A04_GS	493	RYVD-SRGGWAR	FGAK	ADRFVQAK	QKY-	DPKKL	SPGQDIFN	533	
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	512	PVWG-SQREQKRF	FGNL	JP-FVQAK	SKY-	DPKAIL	SPGQDIFN	555	
chr2_32cM-M1-MGS	477	PHVA-SQDGRST	FGAK	ISAVTEL	QKY-	DPVGL	SPGQDIFN	520	
chr2_32cM-M2-MGS	474	PVMT-SQDGRST	FGAK	ISAVADL	QKY-	DPHAIL	SPGQDIFN	517	
chr6_79cM_DsJ0006A22-GS	469	PHHA-SRGGJRRH	FGAK	JGAVADL	QARY-	DPRAILLSPGQDIF	PPPPSPPPPA	521	
AtCKX2	501	---	---	---	---	---	---	501	
AtCKX3	523	---	---	---	---	---	---	523	
AtCKX4	524	---	---	---	---	---	---	524	
chr1_25cM_P695A04_GS	533	---	---	---	---	---	---	533	
chr1_27cM_P419B01_FcDNA	556	---	PLA	---	---	---	---	558	
chr2_32cM-M1-MGS	521	---	PMALVAM	---	---	---	---	527	
chr2_32cM-M2-MGS	518	---	SMVAVSM	---	---	---	---	524	
chr6_79cM_DsJ0006A22-GS	522	GEPITAS	---	---	---	---	---	528	

図 10



1 / 4 1

SEQUENCE LISTING

<110> HONDA MOTOR CO., LTD.

<120> Gene Increasing The Crop And Use Thereof

<130> H3-A0201P

<150> US 60/425,919

<151> 2002-11-13

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5400

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(108)

<223>

<220>

2 / 4 1

<221> exon

<222> (109).. (817)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (818).. (908)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (909).. (1375)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (1376).. (3823)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (3824).. (4089)

<223>

<220>

<221> Intron

3 / 4 1

<222> (4090).. (4540)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (4541).. (5400)

<223>

<400> 1

acagctctac tgtctatcta gctatctatc agctgccttc catcgtcagc acacaaacta 60

cacaagaatc tgcttattta taggccacct tgtcccttct acaatgggtgc aagaacacac 120

aaattcacac acacactgac acacacaaac cgaatcgattg attgattgat a atg aag 177

Met Lys

1

caa gag cag gtc agg atg gca gtg ctc ctc atg ctc aac tgc ttc gtc 225

Gln Glu Gln Val Arg Met Ala Val Leu Leu Met Leu Asn Cys Phe Val

5

10

15

aag gcc acg gcg ccg ccg cca tgg ccg ccg tcg gct tcg tcc gcc tcc 273

Lys Ala Thr Ala Pro Pro Pro Trp Pro Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser

20

25

30

ttc ctc gac gac ctc ggc gac ctc ggc atc gcg ccg ctc atc cgc gcc 321

4 / 4 1

Phe Leu Asp Asp Leu Gly Asp Leu Gly Ile Ala Pro Leu Ile Arg Ala

35

40

45

50

gac gag gcg ggc acc gcg cgc gcc tcc gcc gac ttt ggc aac ctc tcc 369

Asp Glu Ala Gly Thr Ala Arg Ala Ser Ala Asp Phe Gly Asn Leu Ser

55

60

65

gtc gcc ggc gtc ggg gcg cct cgg ctc gcc gcc gcc gcc gcc gtg ctc 417

Val Ala Gly Val Gly Ala Pro Arg Leu Ala Ala Ala Ala Val Leu

70

75

80

tac ccg tcg cgc ccc gcc gac atc gcc gcg ctg ctg cgc gcg tcg tgc 465

Tyr Pro Ser Arg Pro Ala Asp Ile Ala Ala Leu Leu Arg Ala Ser Cys

85

90

95

gca cgc ccg gcg ccg ttc gcg gtg tcc gcg cgg ggg tgt ggc cac tcg 513

Ala Arg Pro Ala Pro Phe Ala Val Ser Ala Arg Gly Cys Gly His Ser

100

105

110

gtg cac ggc cag gcc tcc gcg ccc gac ggc gtc gtc gtc gac atg gcg 561

Val His Gly Gln Ala Ser Ala Pro Asp Gly Val Val Val Asp Met Ala

115

120

125

130

tcg ctc ggc cgc ctg cag ggc ggc ggc gcg cgg cgc ctc gcc gtg tca 609

Ser Leu Gly Arg Leu Gln Gly Gly Gly Ala Arg Arg Leu Ala Val Ser

135

140

145

5 / 4 1

gtg gag ggg cgg tac gtc gac gcc ggc ggc gag cag ctg tgg gtg gac 657
Val Glu Gly Arg Tyr Val Asp Ala Gly Gly Glu Gln Leu Trp Val Asp
150 155 160

gtg ctg cgc gcg tcc atg gcg cac ggg ctc acg ccg gtg tcg tgg aca 705
Val Leu Arg Ala Ser Met Ala His Gly Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr
165 170 175

gac tac ctc cac ctc acc gtc ggc ggc acg ctg tcc aac gcc ggc atc 753
Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile
180 185 190

agc ggc cag gcc ttc cgc cat ggc ccc cag att tcc aac gtg cta gag 801
Ser Gly Gln Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu
195 200 205 210

ctc gac gtc atc acc g gtacgtagat ccatcacatc tactaagaca cgcgccgcca 857
Leu Asp Val Ile Thr
215

tgatcgaggi aattaaggta taggtgtttt gacgtatata tgtatctgca g gt gtc 913
Gly Val

ggg gag atg gtg acg tgc tcg aag gag aag gcg ccg gac ctg ttc gac 961

6 / 4 1

Gly Glu Met Val Thr Cys Ser Lys Glu Lys Ala Pro Asp Leu Phe Asp

220

225

230

gcg gtg ctg ggc ggg ctg ggg cag ttc ggc gtc atc acg cgg gcg cgc 1009

Ala Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Val Ile Thr Arg Ala Arg

235

240

245

atc ccg ctc gcg ccg gcg ccg gcg agg gcg cgg tgg gtg cgg ttc gtg 1057

Ile Pro Leu Ala Pro Ala Pro Ala Arg Ala Arg Trp Val Arg Phe Val

250

255

260

265

tac acg acg gcg gcg gcg atg acg gcc gac cag gag cgc ctc atc gcc 1105

Tyr Thr Thr Ala Ala Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ala

270

275

280

gtc gat cgc gcc ggc ggc gcc ggc gcg gtg ggc ggg ctg atg gac tac 1153

Val Asp Arg Ala Gly Gly Ala Gly Ala Val Gly Gly Leu Met Asp Tyr

285

290

295

gtc gag ggc tcg gtc cac ctg aac cag ggc ctg gtc gag acc tgg cgc 1201

Val Glu Gly Ser Val His Leu Asn Gln Gly Leu Val Glu Thr Trp Arg

300

305

310

acg cag ccg cag ccg cct tcg ccg tcc tcc tcc tcc tcc tca tcc ttc 1249

Thr Gln Pro Gln Pro Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe

315

320

325

7 / 4 1

ttc tcc gac gcc gac gag gcc cgc gtc gcc gcg ctc gcc aag gag gcc 1297
Phe Ser Asp Ala Asp Glu Ala Arg Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala
330 335 340 345

ggc ggc gtg ctg tat ttc ctc gag ggc gcc atc tac ttc ggc ggc gcc 1345
Gly Gly Val Leu Tyr Phe Leu Glu Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Gly Ala
350 355 360

gcc ggg ccg tcc gcc gcc gac gtt gac aag gtatactagc tagctactag 1395
Ala Gly Pro Ser Ala Ala Asp Val Asp Lys
365 370

cttgctctgc gctgagccga ccagagcggg tcccacctcg tgaigatggc gggaacaact 1455

aagctgcaaa aacttttggc gccacctggg gcttacgctt acgcacgcat gcaattaagg 1515

ggtgttctag atggggctaa aacttttttag cccatgtcac atcggaatgtt tggacgctaa 1575

tttggagtat taaatataga ctaataaaaa aactaatitc ataaatgaga gctaattccgc 1635

gagacgaatt ttttaagcct aattaatcta taattataaa agtttatgtt agcatcacat 1695

tgtaaaaatc atgacataat tagactcaaa agattcgict cgtgaattag tccaagatat 1755

ggaatatgtt ttataattag tgtatgttta atactccaaa ttagtattca aacatctggt 1815

8 / 41

gtgacatgga ctiggaataa gtccgtggaa accaaacaga ccctaacggt gcatgaaatt 1875

gaagtctctt gcgccgtcga catcgicgia ctiggcctac cacttttgc tgccacgcga 1935

tgcacctctc gctatcacac acctaactgg aagtaattaa ataattattc gattctgtgt 1995

taattttttt ttatcttcct tagttcccg agagacaaag attagatact atagiagcaa 2055

cttagtaagc tagtatatgg agtattaggt tagtcgcct cactaagctt aaacaggtgt 2115

ataaaatata tgcacgtct gatcgtgaca tattctttta gctacttatg gtgaaaactt 2175

tttcgtccaa aacagtga aaacatgcgtg ctagtgtagg tagtagctac caggacgaat 2235

tatatcatta acagtatttg tagcacatca aggaaaaact tgccttttta aacactgtta 2295

cagtcttcag aacgcacaac tttaacaggt attttgttat tatatttttt taaaaaaaaa 2355

taaaggtaat aaaattatgg tattgtaaaa gtatatTTTT aaggaaaatc atataaccaa 2415

tcaaaagttt atgaagatat acatatigat gticaaagtt actaaaagtt gacttaaaca 2475

tcacattttc atcttgacca aagagggttc atatatatac tccctcaatt ttaaaatata 2535

agcatttcta attatatgca tctagacaaa tgcatataaa aatactttat tttttaaagt 2595

9 / 41

gagggagtat caattttgag catgtagcta gactagatta gtgtatgtct acgcacatat 2655

ctgttgttct gcacaaaact actactcatic ggiccataaaa tataagaatt taaaattgga 2715

tgggacatac cctaatacaa tgaattitaga catggacata tactagtaat accatgtact 2775

acctccatcc caaaataagt tcacttttca tccatctcac acataccaat agaaagtact 2835

acaaatttcg gttatttctct attttcacia actccgatgc aatgattatt ttaaaaataa 2895

acttatttta gaataaatgg aatgagcaaa atataaactg gtgtgtttga ggagaagggg 2955

attgaggaga ttgggaagat acgcaaaacg aggtgagcca ttagctcatg attaattgag 3015

tattaactat tttaaatttc aaaaatggat taatatgatt ttttaaagca actttcctat 3075

ataaaatttt tacaaaaaac acaccgttta atagtittga aagcgtactt gcggaaaacg 3135

aggtagcttc tccctcaatg tcgtccaaac gaacgctgcc ttattacggg actgaggaat 3195

tagagctttg ccagaaagaa atcagcatcg ccagcttgga cctaccaatcc atgcatgcat 3255

catgtggcca ttgacacatc acatagtatg tgctagctag ctagcttttg atcatagtta 3315

catgtatcta gctaggctag aagctggaaa ccgatggata tgatggatct ctcatggatg 3375

1 0 / 4 1

acaggccagc caaagatctg tgcgccacta gatacagtgc atgcatcagc ttgtatggtt 3435
ataaccctag ctaggcagct ttagcacaca catgcatatg catgcatgag ccccatctt 3495
ttgcaacacg accgaccaac tatgttggct ctatatagat agctagctag ttattccaig 3555
catatacagt ttgcatttcc tagctatagc ttttgctatg tgatccgaga agatcctgca 3615
tgcccacacg tgacacgtca cacacacatg tggacaaagt actgcctcac tttatccttg 3675
catgacgtca cgtgccacc tgcctatcca cgctgctagt gctggcaaaa ttaataactc 3735
gatcaaattt cggatgcttc tctgcaaaga atttgatgaa tttaccaac atatatgctt 3795
taatttcttt gcttgatttt atttgcag agg atg gat gtg ctg cgt cgc gag 3847

Arg Met Asp Val Leu Arg Arg Glu

375

ctg cgg cac gag cgc ggg ttc gtg ttc gcg cag gac gtg gcg tac gcc 3895
Leu Arg His Glu Arg Gly Phe Val Phe Ala Gln Asp Val Ala Tyr Ala
380 385 390 395

ggg ttc ctg gac cgc gtc cac gac ggc gag ctc aag ctc cgc gcc gcg 3943
Gly Phe Leu Asp Arg Val His Asp Gly Glu Leu Lys Leu Arg Ala Ala

400

405

410

1 1 / 4 1

ggg ctc tgg gac gtg ccg cac cca tgg ctg aac ctg ttc ctc ccc cgc 3991

Gly Leu Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Leu Pro Arg

415

420

425

tcc ggc gtc ctc gcc ttc gcc gac ggc gtc ttc cac ggc atc ctc agc 4039

Ser Gly Val Leu Ala Phe Ala Asp Gly Val Phe His Gly Ile Leu Ser

430

435

440

cgc acc ccc gcc atg ggc ccc gtc ctc atc tac ccc atg aac cgc aac 4087

Arg Thr Pro Ala Met Gly Pro Val Leu Ile Tyr Pro Met Asn Arg Asn

445

450

455

aa gtaataataa taataaaaag ctttactaca tatacacatg tatataattt 4139

Lys

ttaacgggggtg gattttttcg ttcaaaatga cgacccctca tattgtgcgt gtcgtctgaa 4199

aacttattaa aatgittaaa taaaaaattia atatgataca taaatatatt atatatcact 4259

atataaacat tgtaatctta aactcaactt gcacaagtag taaaaaaca aatttgactg 4319

caaatagigt gtactaagtt atttatttac ttaatgctagt atgctacttg aatttaaacg 4379

tacatatitaa tgaagtggta taitatatat ttccagagta tttttatggg tcttttacga 4439

1 2 / 4 1

catgaaaaac aatgtccgtt ctcttgaagg atgaatagac tticcttaat tttaacatat 4499

atgggtggtaa ctaaacatac acacacctgg atatgtttca g g tgg gac agt aac 4553

Trp Asp Ser Asn

atg tcg gca gtg atc acc gac gac gac ggt gac gag gtg ttc tac acg 4601

Met Ser Ala Val Ile Thr Asp Asp Asp Gly Asp Glu Val Phe Tyr Thr

465 470 475 480

gtg ggg atc ctg cgg tcg gcg gcg gcg gcc ggc gac gtg ggg agg ctg 4649

Val Gly Ile Leu Arg Ser Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Gly Arg Leu

485 490 495

gag gag cag aac gac gag atc ttg ggt ttc tgc gag gtg gcc ggg ata 4697

Glu Glu Gln Asn Asp Glu Ile Leu Gly Phe Cys Glu Val Ala Gly Ile

500 505 510

gcc tac aag cag tac ctg cct tac tac ggc agc cag gca gag tgg cag 4745

Ala Tyr Lys Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr Gly Ser Gln Ala Glu Trp Gln

515 520 525

aag cgg cac ttc ggt gcc aat ctc tgg cca aga ttc gtg cag cgg aag 4793

Lys Arg His Phe Gly Ala Asn Leu Trp Pro Arg Phe Val Gln Arg Lys

530 535 540

1 3 / 4 1

agc aag tat gat cca aag gcc atc ctg tcc cgt ggc cag ggg att ttc 4841
Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Leu Ser Arg Gly Gln Gly Ile Phe
545 550 555 560

acg tca cca ctc gca tga aatgacacat gtaigcaaat gcatatctac 4889
Thr Ser Pro Leu Ala
565

atgcgtatat atacacgtat atatacgtat gtaigcatac acatatgggt giactigtga 4949

tacgttatag cacactgcag ctaattaaagc ttgacaggga gatcgatcaa tggacaatgc 5009

tctagtcaag ctaatatataa taatggagta gtagtatata tgtagtgcga gataattaaag 5069

tagtgtgttt gcctactaaa aggagaggca aagtagtact gtgatgcatg catgccaaact 5129

aataggtgat aagtacgtgt gtgtggccgc atgtatgatt agaagaagtt ggtttttaat 5189

taattaatta ggcatgtat gtaaataat agtacagtac tacgtactac tagtgtacta 5249

ccagccaatt tgcattcatg catggatgcc ttcatatgca tgcgatctc aaacgtacgg 5309

catgcttgaa tgcattcatg tgcatactta tcgtcgtctt gtgggtgtaa actaaattaa 5369

tcttagttat atgtattata agtttgcaat a 5400

14 / 41

<210> 2

<211> 2302

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 2

gcaagaacac acaaattcac acacacactg acacacacaa accgatcgat tgattgattg 60

ataatgaagc aagagcaggt caggatggca gtgtctctca tgtcgaactg ctctgtcaag 120

gccacggcgc cgccgccatg gccgccgtcg gcttctgtccg cctctttcct cgacgacctc 180

ggcgacctcg gcatcgcgcc gctcatccgc gccgacgagg cgggcaccgc gcgcgccttc 240

gccgactttg gcaacctctc cgtcgccggc gtcggggcgc ctcggtcgc cgccgccgcc 300

gccgtgtctt acccgtcgcg ccccgccgac atcgccgcgc tgcctgcgc gtcgtgcga 360

cgcccggcgc cgttcgcggt gtccgcgcgg ggggtgtggc actcggtgca cggccaggcc 420

tccgcgcccg acggcgctgt cgtcgacatg gcgtcgctcg gccgcctgca gggcggcggc 480

gcgcggcgcc tcgccgtgtc agtggagggg cggctacgtc acgccggcgg cgagcagctg 540

1 5 / 4 1

tgggtggacg tgctgcgcgc gtccatggcg cacgggctca cgccgggtgc gtggacagac 600

tacctccacc tcaccgtcgg cggcacgctg tccaacgccg gcatcagcgg ccaggccttc 660

cgccatggcc cccagatttc caacgtgcta gagctcgacg tcatcaccgg tgtcggggag 720

atggtgacgt gctcgaagga gaaggcgccg gacctgttcg acgcggtgct gggcgggctg 780

gggcagttcg gcgtcatcac gcgggcgcgc atcccgctcg cgccggcgcc ggcgaggcgc 840

cgttgggtgc ggttcgtgta cacgacggcg gcggcgatga cggccgacca ggagcgcctc 900

atcgccgtcg atcgcgccgg cggcgccggc gcggtgggcg ggctgatgga ctacgtcgag 960

ggctcggtec accigaacca gggcctggtc gagacctggc gcacgcagcc gcagccgcct 1020

tcgccgtcct cctcctcctc ctcatccttc ttctccgacg ccgacgaggc ccgcgtcgcc 1080

gcgctcgcca aggaggccgg cggcgtgctg tatttcctcg agggcgccat ctacttcggc 1140

ggcgccgccg ggccgtccgc cgccgacgtt gacaagagga tggatgtgct gcgtcgcgag 1200

ctgcggcacg agcgcggggt cgigttcgcg caggacgtgg cgtacgccgg gticctggac 1260

cgcgtccacg acggcgagct caagctccgc gccgcggggc tctgggacgt gccgcaccca 1320

1 6 / 4 1

tggctgaacc tgttcctccc ccgtccggc gtcctgcct tcgccgacgg cgtcttccac 1380

ggcatcctca gccgcacccc cgccatgggc cccgtcctca tctaccccat gaaccgcaac 1440

aagtgggaca gtaacatgtc ggcagtgate accgacgacg acggtagcga ggtgttctac 1500

acggtgggga tcctgcggtc ggcggcggcg gccggcgacg tggggaggct ggaggagcag 1560

aacgacgaga tcttgggttt ctgcgaggig gccgggatag cctacaagca gtacctgcct 1620

tactacggca gccaggcaga gtggcagaag cggcacttcg gtgccaatct ctggccaaga 1680

ttcgtgcagc ggaagagcaa gtaigatcca aaggccatcc tgtcccgigg ccaggggatt 1740

ttcacgtcac cactcgcatg aaatgacaca tgtatgcaaa tgcatactta catgcgtata 1800

tatacacgta tatatacgta tgtatgcata cacatatggg tgtactgtgc atacgttata 1860

gcacactgca gctaatlaag cttagacagg agatcgatca atggacaatg ctctagtcaa 1920

gctaatataa ataatggagt agtagtatat atgtagtgcg agataattaa gtagtgtgtt 1980

tgcctactaa aaggagaggc aaagtagtac tgtgatgcat gcatgccaac taataggatga 2040

taagtacgtg tgtgtggccg catgtatgat tagaagaagt tggtttttaa ttaattaatt 2100

17/41

aggatcatgta tglaaatata tagtacagta ctacgtacta ctagtgtact accagccaat 2160

ttgcatgcat gcatggatgc cticatatgc atgtcgatct caaacgtacg gcatgcttga 2220

atgcatcatg atgcataatct atcgctcgtct tgtgggtgta aactaaatta atcttagtta 2280

tatgtattat aagtttgcaa ta 2302

<210> 3

<211> 565

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 3

Met Lys Gln Glu Gln Val Arg Met Ala Val Leu Leu Met Leu Asn Cys

1 5 10 15

Phe Val Lys Ala Thr Ala Pro Pro Pro Trp Pro Pro Ser Ala Ser Ser

20 25 30

Ala Ser Phe Leu Asp Asp Leu Gly Asp Leu Gly Ile Ala Pro Leu Ile

35 40 45

Arg Ala Asp Glu Ala Gly Thr Ala Arg Ala Ser Ala Asp Phe Gly Asn

50 55 60

18 / 41

Leu Ser Val Ala Gly Val Gly Ala Pro Arg Leu Ala Ala Ala Ala Ala

65

70

75

80

Val Leu Tyr Pro Ser Arg Pro Ala Asp Ile Ala Ala Leu Leu Arg Ala

85

90

95

Ser Cys Ala Arg Pro Ala Pro Phe Ala Val Ser Ala Arg Gly Cys Gly

100

105

110

His Ser Val His Gly Gln Ala Ser Ala Pro Asp Gly Val Val Val Asp

115

120

125

Met Ala Ser Leu Gly Arg Leu Gln Gly Gly Gly Ala Arg Arg Leu Ala

130

135

140

Val Ser Val Glu Gly Arg Tyr Val Asp Ala Gly Gly Glu Gln Leu Trp

145

150

155

160

Val Asp Val Leu Arg Ala Ser Met Ala His Gly Leu Thr Pro Val Ser

165

170

175

Trp Thr Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala

180

185

190

Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val

1 9 / 4 1

195

200

205

Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr Gly Val Gly Glu Met Val Thr Cys Ser

210

215

220

Lys Glu Lys Ala Pro Asp Leu Phe Asp Ala Val Leu Gly Gly Leu Gly

225

230

235

240

Gln Phe Gly Val Ile Thr Arg Ala Arg Ile Pro Leu Ala Pro Ala Pro

245

250

255

Ala Arg Ala Arg Trp Val Arg Phe Val Tyr Thr Thr Ala Ala Ala Met

260

265

270

Thr Ala Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ala Val Asp Arg Ala Gly Gly Ala

275

280

285

Gly Ala Val Gly Gly Leu Met Asp Tyr Val Glu Gly Ser Val His Leu

290

295

300

Asn Gln Gly Leu Val Glu Thr Trp Arg Thr Gln Pro Gln Pro Pro Ser

305

310

315

320

Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Phe Ser Asp Ala Asp Glu Ala

325

330

335

20 / 41

Arg Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Gly Gly Val Leu Tyr Phe Leu

340

345

350

Glu Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Gly Ala Ala Gly Pro Ser Ala Ala Asp

355

360

365

Val Asp Lys Arg Met Asp Val Leu Arg Arg Glu Leu Arg His Glu Arg

370

375

380

Gly Phe Val Phe Ala Gln Asp Val Ala Tyr Ala Gly Phe Leu Asp Arg

385

390

395

400

Val His Asp Gly Glu Leu Lys Leu Arg Ala Ala Gly Leu Trp Asp Val

405

410

415

Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Leu Pro Arg Ser Gly Val Leu Ala

420

425

430

Phe Ala Asp Gly Val Phe His Gly Ile Leu Ser Arg Thr Pro Ala Met

435

440

445

Gly Pro Val Leu Ile Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asp Ser Asn

450

455

460

Met Ser Ala Val Ile Thr Asp Asp Asp Gly Asp Glu Val Phe Tyr Thr

465

470

475

480

21 / 41

Val Gly Ile Leu Arg Ser Ala Ala Ala Gly Asp Val Gly Arg Leu

485

490

495

Glu Glu Gln Asn Asp Glu Ile Leu Gly Phe Cys Glu Val Ala Gly Ile

500

505

510

Ala Tyr Lys Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr Gly Ser Gln Ala Glu Trp Gln

515

520

525

Lys Arg His Phe Gly Ala Asn Leu Trp Pro Arg Phe Val Gln Arg Lys

530

535

540

Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Leu Ser Arg Gly Gln Gly Ile Phe

545

550

555

560

Thr Ser Pro Leu Ala

565

<210> 4

<211> 5003

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

2 2 / 4 1

<221> exon

<222> (1).. (687)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (688).. (778)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (779).. (1245)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (1246).. (3424)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (3425).. (3690)

<223>

<220>

<221> Intron

23 / 41

<222> (3691).. (4141)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (4142).. (5003)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (4037).. (4062)

<223> "n" indicates a, t, g, or c.

<400> 4

gcaagaacac acaaattcac acacacacig acacacacaa atigata atg aag caa 56

Met Lys Gln

1

gag cag gtc agg atg gca gtg ctc ctc atg ctc aac tgc ttc gtc aag 104

Glu Gln Val Arg Met Ala Val Leu Leu Met Leu Asn Cys Phe Val Lys

5

10

15

gcc acg gcg ccg ccg cca tgg ccg ccg tcg gct tcg tcc gcc tcc ttc 152

Ala Thr Ala Pro Pro Pro Trp Pro Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Phe

20

25

30

35

24 / 41

ctc gac gac ctc ggc gac ctc ggc atc gcg ccg ctc atc cgc gcc gac 200

Leu Asp Asp Leu Gly Asp Leu Gly Ile Ala Pro Leu Ile Arg Ala Asp

40

45

50

gag gcg gcc acc gcg cgc gcc tcc gcc gac ttt ggc aac ctc tcc gtc 248

Glu Ala Ala Thr Ala Arg Ala Ser Ala Asp Phe Gly Asn Leu Ser Val

55

60

65

gcc ggc gtc ggg gcg cct cgg ctc gcc gcc gcc gtg ctc tac ccg tgc 296

Ala Gly Val Gly Ala Pro Arg Leu Ala Ala Ala Val Leu Tyr Pro Ser

70

75

80

cgc ccc gcc gac atc gcc gcg ctg ctg cgc gcg tgc tgc gca cgc ccg 344

Arg Pro Ala Asp Ile Ala Ala Leu Leu Arg Ala Ser Cys Ala Arg Pro

85

90

95

gcg ccg ttc gcg gtg tcc gcg cgg ggg tgt ggc cac tgc gtg cgc gcc 392

Ala Pro Phe Ala Val Ser Ala Arg Gly Cys Gly His Ser Val Arg Gly

100

105

110

115

cag gcc tcc gcg ccc gac ggc gtc gtc gtc gac atg gcg tgc ctc gcc 440

Gln Ala Ser Ala Pro Asp Gly Val Val Val Asp Met Ala Ser Leu Gly

120

125

130

cgc ctg cag ggc ggc ggc gcg cgg cgc ctc gcc gtg tca gtg gag ggg 488

Arg Leu Gln Gly Gly Gly Ala Arg Arg Leu Ala Val Ser Val Glu Gly

2 5 / 4 1

135

140

145

cgg tac gtc gac gcc ggc ggc gag cag ctg tgg gtg gac gtg ctg cgc 536

Arg Tyr Val Asp Ala Gly Gly Glu Gln Leu Trp Val Asp Val Leu Arg

150

155

160

gcg tcc atg gcg cac ggg ctc acg ccg gtc tgc tgg aca gac tac ctc 584

Ala Ser Met Ala His Gly Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu

165

170

175

cac ctc acc gtc ggc ggc acg ctg tcc aac gcc ggc atc agc ggc cag 632

His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln

180

185

190

195

gcc ttc cgc cat ggc ccc cag att tcc aac gtg cta gag ctc gac gtc 680

Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val

200

205

210

atc acc g gtacgtagat ccatcacatc tactaagaca cgcgccgcca tgatcgaggt 737

Ile Thr

aattaaggta taggtgtttt gacgtataca tgtatctgca g gt gtc ggg gag atg 792

Gly Val Gly Glu Met

215

26 / 41

gtg acg tgc tgc aag gag aag gcg ccg gac ctg ttc gac gcg gtg ctg 840
Val Thr Cys Ser Lys Glu Lys Ala Pro Asp Leu Phe Asp Ala Val Leu
220 225 230

ggc ggg ctg ggg cag ttc ggc gtc atc acg cgg gcg cgc atc ccg ctc 888
Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Val Ile Thr Arg Ala Arg Ile Pro Leu
235 240 245 250

gcg ccg gcg ccg gcg agg gcg cgg tgg gtg cgg ttc gtg tac acg acg 936
Ala Pro Ala Pro Ala Arg Ala Arg Trp Val Arg Phe Val Tyr Thr Thr
255 260 265

gcg gcg gcg atg acg gcc gac cag gag cgc ctc atc gcc gtc gat cgc 984
Ala Ala Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ala Val Asp Arg
270 275 280

gcc ggc ggc gcc ggc gcg gtg ggc ggg ctg atg gac tac gtc gag ggc 1032
Ala Gly Gly Ala Gly Ala Val Gly Gly Leu Met Asp Tyr Val Glu Gly
285 290 295

tcg gtc cac ctg aac cag ggc ctg gtc gag acc tgg cgc acg cag ccg 1080
Ser Val His Leu Asn Gln Gly Leu Val Glu Thr Trp Arg Thr Gln Pro
300 305 310

cag ccg cct tcg ccg tcc tcc tcc tcc tcc tca tcc ttc ttc tcc gac 1128
Gln Pro Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Phe Ser Asp

27 / 41

315	320	325	330	
gcc gac gag gcc cgc gtc gcc gcg ctc gcc aag gag gcc ggc ggc gtg				1176
Ala Asp Glu Ala Arg Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Gly Gly Val				
	335	340	345	
ctg tat ttc ctc gag ggc gcc atc tac ttc ggc ggc gcc gcc ggg ccg				1224
Leu Tyr Phe Leu Glu Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Gly Ala Ala Gly Pro				
	350	355	360	
tcc gcc gcc gac gti gac aag gtatactagc tagctactag cttgctctgc				1275
Ser Ala Ala Asp Val Asp Lys				
	365			
gctgcgccga ccagagcggg tcccacctcg tgatgatggc gggaacaact aagctgcaaa				1335
aacittttggc gccacctggg gcttacgcctt acgcacgcat gcaattaagg ggggtgttcag				1395
atcgggctgc ccatgtcaca tcggatgttt agacgctaatt ttagagtatt aaacatagac				1455
taataaaaaa actaatttca taaatgagag ttatccgcga gacgaatittt ttaagcacaa				1515
ttaatctata attataaaaa gtttactigia gcatcacatt gtcaaatca tgatataatt				1575
agactcaaag attcgcttca tgaattagtc caagaatata gaatgtgttt tataattagt				1635

28 / 41

gtaigtattat tagtatccaa acatccgatg tgataaggac ttagaataag ttttccaaac 1695

aggacctaac ggtgcatgaa attgaagict ctgcgccgt cgacatcgic gtacttggcc 1755

taccactttt gtctgccacg cgaatgcacct ctgcctatca cacacctaac tggaagtaat 1815

taaataatta ttcgattctg tgttaatttt tttttatctt ccttagttct cggagagaca 1875

aagattagat actatagtag caacttagta agctagtata tggagtatta ggttagtcgc 1935

tctcactaag cttaaacagg tgtataaaat atatgcatcg tctgatcgtg acatatcttt 1995

ttagctactt atggtgaaaa ctttttcgic caaaacagtg aaaagcatgc atgctagtgt 2055

aggtagtagc taccaggacg aattatatca ttaacagtat ttgtagcaca tcaaggaaaa 2115

acttgtcttt ttaaacactg ttacagtcct cagaacgcac aactttaaca ggtatttttg 2175

tattatattt ttttaaaaaa aataaaggta ataaaattat ggtattgtaa aagtatattt 2235

ttaaggaaaa tcatataacc aatcaaaagt ttatgaagat atacatatig atgttcaaag 2295

ttactaaaag ttgacttaaa catcacattt tcatcttgac caaagagggt tcatatatai 2355

actccctcaa ttttaaaata taagcatttc taattatatg catctagaca aatacatata 2415

29 / 41

aatatacttt aittttttaa gtgagggagt atcaattttg agcatgtagc tagactagat 2475

tagtgtatgt ctacgcacat atctgttgat ctgcacaaaa ctactactca tctatcctaa 2535

aatataagaa tttaaaattg gatgggacat accctaatac aatgaatcta gacatggaca 2595

tatactagta ataccatgta ctatctccat cccaaaaataa gttcactttt catccatctc 2655

atacatatac caatagaaaag tactaaaaat ttcggttatt ctctattttc acaaactccg 2715

atgcaatgat tatttttaaaa ataaacitat tttagaataa atggaatgag caaaatataa 2775

acttattacg ggactgagga attagagctt tgcagaaaag aaatcagcat cgccagcttg 2835

gacctaccat ccatgcatgc atcatgtggc cattgacaca tcacatagta tgtgctagct 2895

agctagcttt tgatcatagt tacatgtatc tagctaggct agaagctgga aaccgatgga 2955

tatgatggat ctctcatgga tgacaggcca gccaaagatc tgtgcgccac tagatacagt 3015

gcatgcatca gcttgtatgg ttataaccct agctagccag ctttagcaca cacatgcata 3075

tgcatgatga gccccatct ttigcaacac gaccgaccaa ctatgttggc catatataga 3135

tagctagcta gttattccat gcatatacag ttgcatitc ctagctatag cttttgctat 3195

30 / 41

gtgatccgag aagatccigc atgcccacac gtgacacgic acacacacat gtggacaaag 3255

tactgcctca ctttatccit gcatgacgic acgicgccac ctgiccatcc acgctgctag 3315

tgctggcaaa attaataact cgatcaaatt tcggtgatct ctctgcaaag aatttgaiga 3375

attttaccaa catataigct ttaatttctt tgittgattt tatttgcag agg atg gat 3433

Arg Met Asp

370

gtg ctg cgt cgc gag ctg cgg cac gag cgc ggg ttc gtg ttc gcg cag 3481

Val Leu Arg Arg Glu Leu Arg His Glu Arg Gly Phe Val Phe Ala Gln

375

380

385

gac gtg gcg tac gcc ggg ttc ctg gac cgc gtc cac gac ggc gag ctc 3529

Asp Val Ala Tyr Ala Gly Phe Leu Asp Arg Val His Asp Gly Glu Leu

390

395

400

aag ctc cgc gcc gcg ggg ctc tgg gac gig ccg cac cca tgg ctg aac 3577

Lys Leu Arg Ala Ala Gly Leu Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn

405

410

415

420

ctg ttc ctc ccc cgc tcc ggc gtc ctc gcc ttc gcc gac ggc gtc ttc 3625

Leu Phe Leu Pro Arg Ser Gly Val Leu Ala Phe Ala Asp Gly Val Phe

425

430

435

3 1 / 4 1

cac ggc atc ctc agc cgc acc ccc gcc atg ggc ccc gtc ctc atc tac 3673

His Gly Ile Leu Ser Arg Thr Pro Ala Met Gly Pro Val Leu Ile Tyr

440

445

450

ccc atg aac cgc aac aa gtaataataa taataaacag ctttactaca 3720

Pro Met Asn Arg Asn Lys

455

tatacacatg tatataattt ttacgggggtg gattttttcg ttcaaaaatga cgatccctca 3780

tattgtgcgt gtcgtctgaa aacttattaa aatgtttaaa taaaaaatta atatgataca 3840

taaatatatt atatatcact atataaacat tataatctta aactcaactt gcacaagtag 3900

taaaaaaaca aatttgactg caaatagtgt gtactaagtt atttatttac ttatgctagi 3960

atgctacttg aatttaaacg tacatatatta tgaagtggta tattataat ttccagagta 4020

tttttatggt tcttttnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ncttgaagg atgaatagac 4080

tttccttaat tttaacatat atggiggttaa ctaaacatac acacacgtgg atatgtttca 4140

g g tgg gac agt aac atg tcg gca gtg atc acc gac gac gac ggt gac 4187

Trp Asp Ser Asn Met Ser Ala Val Ile Thr Asp Asp Asp Gly Asp

460

465

470

3 2 / 4 1

gag gtg ttc tac acg gtg ggg atc ctg cgg tgc gcg gcg gcc ggc 4235

Glu Val Phe Tyr Thr Val Gly Ile Leu Arg Ser Ala Ala Ala Ala Gly

475

480

485

gac gtg ggg agg ctg gag gag cag aac gac gag atc ttg ggt ttc tgc 4283

Asp Val Gly Arg Leu Glu Glu Gln Asn Asp Glu Ile Leu Gly Phe Cys

490

495

500

505

gag gtg gcc ggg ata gcc tac aag cag tac ctg cct tac tac ggc agc 4331

Glu Val Ala Gly Ile Ala Tyr Lys Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr Gly Ser

510

515

520

cag gca gag tgg cag aag cgg cac ttc ggt gcc aag ctc tgg cca aga 4379

Gln Ala Glu Trp Gln Lys Arg His Phe Gly Ala Lys Leu Trp Pro Arg

525

530

535

ttc gtg cag cgg aag agc aag tat gat cca aag gcc atc ctg tcc cgt 4427

Phe Val Gln Arg Lys Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Leu Ser Arg

540

545

550

ggc cag ggg att ttc acg tca cca ctc gca tga aatgacacat gtaigcaaat 4480

Gly Gln Gly Ile Phe Thr Ser Pro Leu Ala

555

560

gcatactctac atgcgtatat atacacgtat atatacgtat gtaigcatac acatatgggt 4540

3 3 / 4 1

gtactgtgca tacgttatag cacactgcag ctaattaagc ttgacagggg gagatcgatc 4600
aatggacaat gccttagtca agctaataa aataatggag tagtagtata tatgtagtgc 4660
gagataatta agtagtgtgt ttgcctacta aaaggagagg caaagtagta ctgtgatgca 4720
tgcatgccaa ctaatagggtg ataagtagt gtgtgtggcc gcatgtatga ttagaagaag 4780
ttggttttta attaattaat taggtcatgt atgtaaatat atagtacagt actacgtact 4840
actagtgtac taccagccaa ttgtcatgca tgcatggatg ccttcatatg catgtcgatc 4900
tcaaacgtac ggcatgcttg aatgcatcat gatgcataac tatcgtcgtc ttgtgggtgt 4960
aaactaaatt aatcttagtt atatgtatta taagtttgca ata 5003

<210> 5

<211> 2282

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

gcaagaacac acaaattcac acacacactg acacacacaa attgataatg aagcaagagc 60
aggtcaggat ggcatgtctc ccatgtctca actgcttcgt caaggccacg gcgccgccgc 120

3 4 / 4 1

caaggccgcc gtcggcttcg tccgcctcct tctcgcacga cctcggcgac ctccggcatcg 180

cgccgctcat ccgcgccgac gaggcggcca ccgcgcgcgc ctccgccgac ttgggcaacc 240

tctccgtcgc cggcgtcggg gcgcctcggc tcgccgccgc cgtgctctac ccgtcgcgcc 300

ccgccgacat cgccgcgctg ctgcgcgcgt cgtgcgcacg cccggcgccg ttcgcggigt 360

ccgcgcgggg gtgtggccac tcggtgcgcg gccaggcctc cgcgcccgac ggcgtcgtcg 420

tcgacatggc gtcgctcggc cgcctgcagg gcggcggcgc gcggcgctc gccgtgicag 480

tggaggggcg gtacgtcgac gccggcggcg agcagctgtg ggtggacgtg ctgcgcgcgt 540

ccatggcgca cgggctcacg ccggtgtcgt ggacagacta cctccacctc accgtcggcg 600

gcacgtgtc caacgccggc atcagcggcc aggccttcgc ccatggcccc cagatttcca 660

acgtgctaga gctcgacgtc atcaccggtg tcggggagat ggtgacgtgc tcgaaggaga 720

aggcgccgga cctgttcgac gcggtgctgg gcgggctggg gcagttcggc gtcatcacgc 780

gggcgcgcat cccgctcgcg ccggcgccgg cgaggcgcg gtgggtgcgg ttcgtgtaca 840

cgacggcggc ggcgatgacg gccgaccagg agcgcctcat cgccgtcgat cgcgccggcg 900

35 / 41

gcgccggcgc ggtgggcggg ctgatggact acgtcgaggg ctcggtccac ctgaaccagg 960

gccitggtcga gacctggcgc acgcagccgc agccgccttc gccgtcctcc tccicctcct 1020

catccttctt ctccgacgcc gacgaggccc gcgtcgccgc gctcgccaag gaggccggcg 1080

gcgtgctgta tttcctcgag ggcgccatct acctcggcgg cgccgccggg ccgtccgccg 1140

ccgacgttga caagaggaig gatgtgctgc gtcgcgagct gcggcacgag cgcgggttcg 1200

tgttcgcgca ggacgtggcg tacgccgggt tccitggaccg cgtccacgac ggcgagctca 1260

agctccgcgc cgcggggctc tgggacgtgc cgcacccatg gctgaacctg ttcctccccc 1320

gctccggcgt cctcgccctc gccgacggcg tcttccacgg catcctcagc cgcacccccg 1380

ccaigggccc cgtcctcatc taccceatga accgcaacaa gtgggacagt aacatgtcgg 1440

cagtgatcac cgacgacgac ggtgacgagg tgttctacac ggtggggatc ctgcggtcgg 1500

cggcggcggc cggcgacgtg gggaggctgg aggagcagaa cgacgagatc ttgggtttct 1560

gcgaggitggc cgggatagcc tacaagcagt acctgcccta ctacggcagc caggcagagt 1620

ggcagaagcg gcacttcggt gccaaagctct ggccaagatt cgtgcagcgg aagagcaagt 1680

36 / 41

aigatccaaa ggccatcctg tcccgtggcc aggggatitc cacgtcacca ctgcgatgaa 1740

atgacacatg taigcaaagc caatactaca tgcgtatata tacacgtata tatacgtatg 1800

taigcatata catatgggtg tactgtgcat acgttatagc acactgcagc taattaagct 1860

tgacaggggg agatcgatca atggacaatg ctctagtcaa gctaataata ataattggagt 1920

agtagtatat atgtagtgcg agataattaa gtagtgtgtt tgcctactaa aaggagaggc 1980

aaagtagtac tigtatgcat gcatgccaac taataggiga taagtacgtg tgtgtggccg 2040

catglatgat tagaagaagt tggtttttaa ttaattaatt aggtcatgta tgtaaata 2100

tagtacagta ctacgtacta ctagtgtact accagccaat ttgcatgcat gcatggatgc 2160

cttcataatgc atgtcgatct caaacgtacg gcatgcttga atgcatcatg atgcataatc 2220

atcgtcgtct tgtgggtgta aactaaatta atcttagita tatgtattat aagtittgcaa 2280

ta 2282

<210> 6

<211> 563

37 / 41

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 6

Met Lys Gln Glu Gln Val Arg Met Ala Val Leu Leu Met Leu Asn Cys

1 5 10 15

Phe Val Lys Ala Thr Ala Pro Pro Pro Trp Pro Pro Ser Ala Ser Ser

20 25 30

Ala Ser Phe Leu Asp Asp Leu Gly Asp Leu Gly Ile Ala Pro Leu Ile

35 40 45

Arg Ala Asp Glu Ala Ala Thr Ala Arg Ala Ser Ala Asp Phe Gly Asn

50 55 60

Leu Ser Val Ala Gly Val Gly Ala Pro Arg Leu Ala Ala Ala Val Leu

65 70 75 80

Tyr Pro Ser Arg Pro Ala Asp Ile Ala Ala Leu Leu Arg Ala Ser Cys

85 90 95

Ala Arg Pro Ala Pro Phe Ala Val Ser Ala Arg Gly Cys Gly His Ser

100 105 110

Val Arg Gly Gln Ala Ser Ala Pro Asp Gly Val Val Val Asp Met Ala

38/41

115

120

125

Ser Leu Gly Arg Leu Gln Gly Gly Gly Ala Arg Arg Leu Ala Val Ser

130

135

140

Val Glu Gly Arg Tyr Val Asp Ala Gly Gly Glu Gln Leu Trp Val Asp

145

150

155

160

Val Leu Arg Ala Ser Met Ala His Gly Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr

165

170

175

Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile

180

185

190

Ser Gly Gln Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu

195

200

205

Leu Asp Val Ile Thr Gly Val Gly Glu Met Val Thr Cys Ser Lys Glu

210

215

220

Lys Ala Pro Asp Leu Phe Asp Ala Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe

225

230

235

240

Gly Val Ile Thr Arg Ala Arg Ile Pro Leu Ala Pro Ala Pro Ala Arg

245

250

255

39 / 41

Ala Arg Trp Val Arg Phe Val Tyr Thr Thr Ala Ala Ala Met Thr Ala

260

265

270

Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ala Val Asp Arg Ala Gly Gly Ala Gly Ala

275

280

285

Val Gly Gly Leu Met Asp Tyr Val Glu Gly Ser Val His Leu Asn Gln

290

295

300

Gly Leu Val Glu Thr Trp Arg Thr Gln Pro Gln Pro Pro Ser Pro Ser

305

310

315

320

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Phe Ser Asp Ala Asp Glu Ala Arg Val

325

330

335

Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Gly Gly Val Leu Tyr Phe Leu Glu Gly

340

345

350

Ala Ile Tyr Phe Gly Gly Ala Ala Gly Pro Ser Ala Ala Asp Val Asp

355

360

365

Lys Arg Met Asp Val Leu Arg Arg Glu Leu Arg His Glu Arg Gly Phe

370

375

380

Val Phe Ala Gln Asp Val Ala Tyr Ala Gly Phe Leu Asp Arg Val His

385

390

395

400

40 / 41

Asp Gly Glu Leu Lys Leu Arg Ala Ala Gly Leu Trp Asp Val Pro His

405

410

415

Pro Trp Leu Asn Leu Phe Leu Pro Arg Ser Gly Val Leu Ala Phe Ala

420

425

430

Asp Gly Val Phe His Gly Ile Leu Ser Arg Thr Pro Ala Met Gly Pro

435

440

445

Val Leu Ile Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asp Ser Asn Met Ser

450

455

460

Ala Val Ile Thr Asp Asp Asp Gly Asp Glu Val Phe Tyr Thr Val Gly

465

470

475

480

Ile Leu Arg Ser Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Gly Arg Leu Glu Glu

485

490

495

Gln Asn Asp Glu Ile Leu Gly Phe Cys Glu Val Ala Gly Ile Ala Tyr

500

505

510

Lys Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr Gly Ser Gln Ala Glu Trp Gln Lys Arg

515

520

525

His Phe Gly Ala Lys Leu Trp Pro Arg Phe Val Gln Arg Lys Ser Lys

41 / 41

530

535

540

Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Leu Ser Arg Gly Gln Gly Ile Phe Thr Ser

545

550

555

560

Pro Leu Ala

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/WPIDS/BIOSIS/MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Houba-Herlin N, Cytokinin oxidase from Zea mays: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts., Plant J. (1999), Vol.17, No.6, pages 615 to 626	<u>1-16</u> 17-19
<u>X</u> A	WO 99/06571 A (UNIV MISSOURI), 11 February, 1999 (11.02.99), & EP 1002096 A & US 6229066 A & CN 1265146 A	<u>1-16</u> 17-19
P,A	WO 03/000898 A (SYNGENTA PARTICIPATONS AG.), 03 January, 2003 (03.01.03), (Family: none)	1-19
A	SASAKI, T. et al., The genome sequence and structure of rice chromosome 1., Nature(2002 November), Vol.420, No.6913, pages 312 to 316	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 December, 2003 (18.12.03)Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14434

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Joseph T. et al., Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development., Plant Physiol.Biochem. (1995), Vol.33, No.3, pages 327 to 336	1-19
P,A	Bilyeu Kristin D. et al., Dynamics of expression and distribution of cytokinin oxidase/dehydrogenase in developing maize kernels., Plant Growth Regulation, (2003 March), Vol.39, No.3, pages 195 to 203	1-19
P,A	Yang SH et al., Functional characterization of a cytokinin oxidase gene DSCKX1 in Dendrobium orchid., Plant Mol Biol., (2003 January), Vol.51, No.2, pages 237 to 248	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/WPIDS/BIOSIS/MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Houba-Herlin N, Cytokinin oxidase from Zea mays: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts., Plant J. (1999), Vol. 17, No. 6, p. 615-626.	<u>1-16</u> 17-19
<u>X</u> A	WO 99/06571 A (UNIV MISSOURI) 1999.02.11 & EP 1002096 A & US 6229066 A & CN 1265146 A	<u>1-16</u> 17-19
PA	WO 03/000898 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 2003.01.03 (ファミリーなし)	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.12.03

国際調査報告の発送日

20.01.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sasaki, T., et. al., The genome sequence and structure of rice chromosome 1., Nature (2002 Nov), Vol. 420, No. 6913, p. 312-316	1 - 1 9
A	Joseph T., et. al., Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development., Plant Physiol. Biochem (1995), Vol. 33, No. 3, p. 327-336	1 - 1 9
P A	Bilyeu Kristin D., et. al., Dynamics of expression and distribution of cytokinin oxidase/dehydrogenase in developing maize kernels., Plant Growth Regulation (2003 March), Vol. 39, No. 3, p. 195-203	1 - 1 9
P A	Yang SH, et. al., Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene DSCX1 in Dendrobium orchid., Plant Mol Biol. (2003 Jan), Vol. 51, No. 2, p. 237-248	1 - 1 9